



Identification d'une nouvelle fonction de la protéine kinase Aurora-A

Alghassimou Diallo

► To cite this version:

Alghassimou Diallo. Identification d'une nouvelle fonction de la protéine kinase Aurora-A. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1S111 . tel-01135894

HAL Id: tel-01135894

<https://theses.hal.science/tel-01135894>

Submitted on 26 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNÉE 2013



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie-Agronomie-Santé

présentée par

Alghassimou DIALLO

Préparée à l'unité de recherche : IGDR-UMR 6290
(Institut de Génétique et Développement de Rennes)
Composante universitaire : UFR Sciences de la Vie et de
l'Environnement

**Identification d'une
nouvelle fonction de
la protéine kinase
Aurora-A**

**Thèse soutenue à la Faculté de
Médecine de l'université de
Rennes1
le 18/12/13**

devant le jury composé de :

Régis GIET

DR2 CNRS / *président*

Katja WASSMANN

DR2 CNRS / *rapporteur*

Sandrine RUCHAUD

CR1 CNRS / *examineur*

Claude PRIGENT

DR1 CNRS / *directeur de thèse*

REMERCIEMENTS

C'est par un matin froid du 18 octobre 2005 que j'ai découvert la France (Paris puis Rennes). Le changement climatique a été dur d'autant plus que j'avais quitté mon pays (la République de Guinée Conakry) pendant la période de forte chaleur. Maintenant, le moment est venu de dire au revoir à « la France ». Mon séjour en France a marqué et marquera ma vie pour toujours. C'était la première fois que je quittais mes parents, mes amis et connaissances et mon pays natal pour aller découvrir un autre pays, une autre culture complètement différents. Il a fallu s'adapter à énormément de choses ; heureusement que je pratiquais déjà la langue française. Il y a eu des hauts et des bas ; des moments de joie, de gaieté et de bonheur mais aussi des instants de doute, les difficultés de la vie et la première hospitalisation de ma vie (j'ai cru y passer !). Donc, c'est tout naturellement que je remercierais la France en premier lieu pour l'accueil et pour avoir participé à ma formation universitaire. Ca a été une expérience enrichissante pour moi.

Un grand merci au professeur Jean François GRONGNET (mon tuteur en France qui m'a toujours accompagné), à Mr Mamadi CAMARA et au Dr Yazora SOROPOGUI qui m'ont permis de venir étudier en France après la signature d'une convention de coopération entre l'Agrocampus Ouest (France) et l'Institut Supérieur Agronomique et Vétérinaire de Faranah (Guinée).

Je remercie tout particulièrement le Dr Claude PRIGENT pour m'avoir accueilli et encadrer durant mes travaux de thèse au sein de l'équipe « Cycle Cellulaire » et dans la "Team Aurora-A SHOKAT". Infiniment merci "**The BOSS**" comme on avait l'habitude de dire avec Jabbar. J'ai été beaucoup impressionné par ta bonne humeur, ta gentillesse et ta disponibilité. Il est une qualité entre autres, la bonne humeur, que je t'envierai vraiment. Ca m'a redonné espoir et confiance à chaque fois que j'ai été assailli par le doute.

Mille mercis au Dr Erwan WATRIN (j'espère que tu auras toujours un peu de temps disponibles pour transmettre tes connaissances scientifiques et techniques en biologie aux étudiants de la faculté de biologie de Rennes 1. En plus, tu en as tellement l'amour et la facilité de transmettre le savoir). Claude et toi vous faites partie de mes meilleurs souvenirs de la France.

Mes sincères remerciements vont à l'endroit des Drs Chantal DESDOUETS et Katja WASSMANN pour avoir accepté d'être rapporteurs avant soutenance de mon jury, ainsi qu'aux Drs Sandrine RUCHAUD (ma tutrice de thèse également) et Régis GIET (président du jury) pour votre participation au Jury.

Je voudrais également remercier tous les membres de l'équipe « Cycle Cellulaire », sans exception aucune, pour les conseils, les orientations (pendant les réunions de labo ou de l'axe biologie cellulaire et développement ou les séminaires internes) et pour la bonne cohabitation durant mon séjour au labo.

Merci aux Drs Stéphanie DUTERTRE et Jacques PECREAU pour la microscopie et Christian et Laura JAULIN pour les conseils, les orientations et pour les anticorps.

Au Dr Jabbar KHAN, mon voisin de bureau, je dis merci pour tout.

A Monsieur Gérard Callioni, mes sincères remerciements pour ton humanisme ; pour les discussions sur l'actualité (nationale et internationale) et sur la politique française. Peut-être que je pourrais me prévaloir dans mon pays comme un vague connaisseur du marigot politique français... En tout cas, ça me permettait de décompresser en m'éloignant un peu de la kinase Shokat, la bien nommée.

Je ne saurais terminer sans remercier mes parents, mes frères et sœurs avec une mention spéciale pour ma mère et mon père qui n'ont ménagé aucun effort pour mon éducation et mon entretien. Merci pour tout le soutien moral et matériel car sans vous je ne serais arrivé à rien dans cette vie ici bas.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'ensemble du personnel enseignants-chercheurs ou non de l'Institut Supérieur Agronomique et Vétérinaire de Faranah (République de Guinée).

Au peuple de Guinée mon sentiment d'indéfectible reconnaissance.

“A mon père (Aguibou DIALLO) et à ma mère (Hadjia Habayatou BARRY) qui ont toujours cru en moi et en la réussite dans la vie par l'école. Aussi, pour m'avoir toujours encouragé à aller le plus loin possible à l'école et soutenu sans faille pour ça. En voici le bout du chemin pointant à l'horizon... pour ce qui est du dernier et le plus haut diplôme de l'école, le « Doctorat ». Que puisse Allah le tout puissant récompenser vos sacrifices et vos efforts.

A mon père et à mon frère Alpha Boubacar Haba DIALLO (alias Bantama), Ingénieur de construction en bâtiments et pistes de son Etat, pour m'avoir appris à lire, écrire, compter et calculer avant d'aller à l'école française.

Enfin, à mon père pour m'avoir personnellement envoyé et inscrit à l'école le premier jour malgré la présence de mes frères et sœurs qui pouvaient le faire aussi bien à sa place. C'est toujours comme si c'était hier. Ca restera éternellement gravé dans ma mémoire”.

SOMMAIRE

ABBREVIATIONS

Liste des figures

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Cycle Cellulaire	1
1. Les Phases du Cycle Cellulaire	1
1.1. Interphase : G1 ; S ; G2	3
1.2. Mitose : Prophase ; Prométaphase ; Métaphase ; Anaphase ; Télophase	4
2. Structures et Mécanismes de la mitose	8
2.1. Des structures cellulaires importantes en mitose :	8
2.1.1. Centrosomes	8
2.1.2. Microtubules	9
2.1.3. Chromosomes	11
2.1.4. Kinétochores (composants du kinétochores)	12
2.1.5. Le Fuseau bipolaire	13
2.2. Des évènements cruciaux en mitose	15
2.2.1. Attachements kinétochores-microtubules	15
2.2.2. Congression des chromosomes	16
2.2.3. Point de contrôle de la mitose (SAC ou KAC)	17
2.2.3.1 Complexe du point de contrôle de la mitose	21
2.2.3.2 Point de contrôle de la mitose ignoré (SAC override)	23
2.2.3.3 Glissement mitotique	24
2.2.4. Cytodiérèse (cytocinèse)	26
Chapitre 2 : Les kinases mitotiques « Aurora »	28
2.1. Historique :	28
2.1.1. Les organismes à une kinase Aurora	28
2.1.2. Les organismes à deux kinases Aurora	29
2.1.3. Les organismes à trois kinases Aurora	30
Aurora-A (initialement nommée Aurora-2)	30
Aurora-B (initialement nommée Aurora-1)	32
Aurora-C (initialement nommée Aurora-3)	33
2.2. Structures et évolution	34
2.3. Régulation de l'activité des kinases « Aurora »	37

2.4. Des partenaires communs aux kinases « Aurora »	40
2.5. Localisation subcellulaire des kinases « Aurora »	41
2.6. Fonctions générales des kinases « Aurora »	43
2.7. Les pathologies liées aux kinases « Aurora »	45
Chapitre 3 : Etude de la kinase Aurora-A	48
3.1. Du gène à l'expression de la protéine	48
3.2. Régulation de l'activité de la kinase Aurora-A	49
3.2.1. Phosphorylation/activation de la kinase Aurora-A	50
3.2.2. Stabilité de la protéine	53
3.2.3. Dégradation de la kinase Aurora-A	55
3.3. Localisation de la protéine	56
4. Fonctions	58
4.1. Entrée en mitose	58
4.2. Maturation et séparation des centrosomes	59
4.3. Mise en place et stabilité du fuseau bipolaire	60
4.3. Autres fonctions de la kinase Aurora-A	62
Chapitre 4 : Résultats	64
Objectifs de la thèse	64
Article	68
Introduction	69
Résumé	70
Conclusions et perspectives	72
Références bibliographiques	82
Annexe	115
Papier # 2	

ABBREVIATIONS

1NaPP1 : 1-Naphthyl PP1

APC/C : Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome

AS : analog-sensitive allèle

ASAP : aster associated protein

ATP : adenosine tri-phosphate

AURKA : Aurora-A kinase

AURKB : Aurora-B kinase

AURKC : Aurora-C kinase

BubR1 : budding uninhibited by benzimidazoles related kinase 1

CDC20/27 : cell-division cycle protein 20/27

CENP-A : centromere protein A

H3S10 : phosphor-Histone 3 serine 10

INCENP : inner centromere protein

Mad2 : mitotic arrest deficient 2

MCC : mitotic checkpoint complex or components

NEBD : nuclear enveloppe breakdown

PLK1 : polo like kinase 1

PP1 : protein phosphatase 1

PP2A: protein phosphatase 2

PP6: protein phosphatase 6

SAC : spindle assembly checkpoint

SAF-A : scaffold attachment factor A

TC cells : Thyroid cancer

Tex14 : testis expressed protein 14

TPX2 : Targeting protein for Xklp2

Liste des figures

Figure 1 : le cycle cellulaire

Figure 2 : les différentes phases de la mitose

Figure 3 : correspondance entre les phases et les transitions en mitose

Figure 4 : structure du centrosome

Figure 5 : le cycle du centrosome

Figure 6 : mécanisme d'assemblage des microtubules

Figure 7 : schéma du recrutement des γ -TuRCs aux centrosomes en interphase

Figure 8 : les structures du kinétochore et leurs fonctions

Figure 9 : les composants du kinétochore

Figure 10 : les différents types de microtubules et le fuseau bipolaire

Figure 11 : attachement et orientation kinétochores-microtubules

Figure 12 : processus de capture et d'attachement bipolaire

Figure 13: mécanisme d'action du point de contrôle de la mitose

Figure 14 : remise en service du point de contrôle de la mitose par la correction des attachements

Figure 15 : modèle d'inactivation de l'APC/C par les protéines du SAC

Figure 16 : modèle de transport vers les pôles du fuseau des protéines kinétochoriennes le long des microtubules par le complexe dynéine/dynactine

Figure 17 : les deux voies d'activation du SAC

Figure 18 : bases moléculaires du SAC

Figure 19 : processus de survenue du glissement mitotique après induction d'un arrêt mitotique avec le taxol

Figure 20 : structure des kinases Aurora-A, -B et -C

Figure 21 : alignement des séquences d'acides aminés du domaine kinase des kinases Aurora humaines A, B et C

Figure 22 : structure des kinases Aurora-A, -B et -C avec l'alignement de leurs domaines régulateurs et catalytiques

Figure 23 : arbre phylogénétique des kinases « Aurora »

Figure 24 : la localisation et quelques fonctions des kinases Aurora-A et -B

Figure 25 : conséquences de la surexpression de la kinase Aurora-A

Figure 26 : activation de la kinase Aurora-A par TPX2

Figure 27 : phosphorylation de Aurora-A avec ou sans TPX2

Figure 28 : modèle d'activation de Aurora-A en deux étapes

Figure 29 : localisation de la kinase Aurora-A au cours des différentes sous-phases de la mitose

Figure 30 : développement des tumeurs chez les souris hétérozygotes

Figure 31 : marquage par immunofluorescence pour mesurer la taille du fuseau mitotique

Figure 32 : schéma illustrant la nécessité de l'activité kinase de Aurora-A dans le maintien du SAC actif

Liste des tableaux

Tableau 1 : Cinétique de survenue du glissement mitotique

Tableau 2 : Composants du SAC

Tableau 3 : Composants et complexes du SAC

Tableau 4 : Nomenclature et classification des kinases « Aurora »

Tableau 5 : Composants du complexe des protéines passagères du chromosome (CPC).

Tableau 6 : Protéines régulatrices de l'activité de la kinase Aurora-A

Tableau 7 : Substrats et partenaires de la kinase Aurora-A

Tableau 8 : Inhibiteurs des kinases « Aurora-A »

Chapitre 1 : Cycle Cellulaire

La cellule est l'unité structurelle et fonctionnelle des organismes vivants. D'où la théorie cellulaire formulée par Mathias Schleiden (1804-1881) et Theodor Schwann (1810-1882) selon laquelle « la cellule est l'élément de base du développement des organismes ». Toutefois, les premières observations microscopiques des cellules de végétaux remontent en 1665 avec Robert Hooke (1635-1703) qui inventa le terme « cellule ».

Par ailleurs, c'est en 1858 que le pathologiste allemand Rudolf Virchow établit le postulat ci-après qui définit et caractérise le cycle de la vie cellulaire : « Chaque organisme vivant apparaît comme la somme d'unités vitales, chacune d'elles porte toutes les caractéristiques de la vie ».

- Tous les êtres vivants sont composés de cellules
- Seule une cellule peut donner naissance à une autre cellule
- La division cellulaire est le « seul chemin vers l'immortalité »

Dans cette introduction de ma thèse, je m'attacherai à décrire la division cellulaire et à présenter brièvement les phases du cycle cellulaire d'une part, et décrire succinctement les mécanismes cellulaires qui gouvernent la formation des deux cellules filles et leur séparation physique : la mitose, d'autre part.

1. Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le mécanisme biologique par lequel une cellule dite « mère » produit deux cellules « filles » génétiquement identiques à elle. La notion de division cellulaire découle des travaux de Rudolf Virchow (1821-1902) en 1858 qui stipule « omnis cellula e cellula : toute cellule provient d'une autre cellule ». Mais c'est Howard (1913-1984) et Pelc (1925-1998) qui établirent en 1953 le concept du

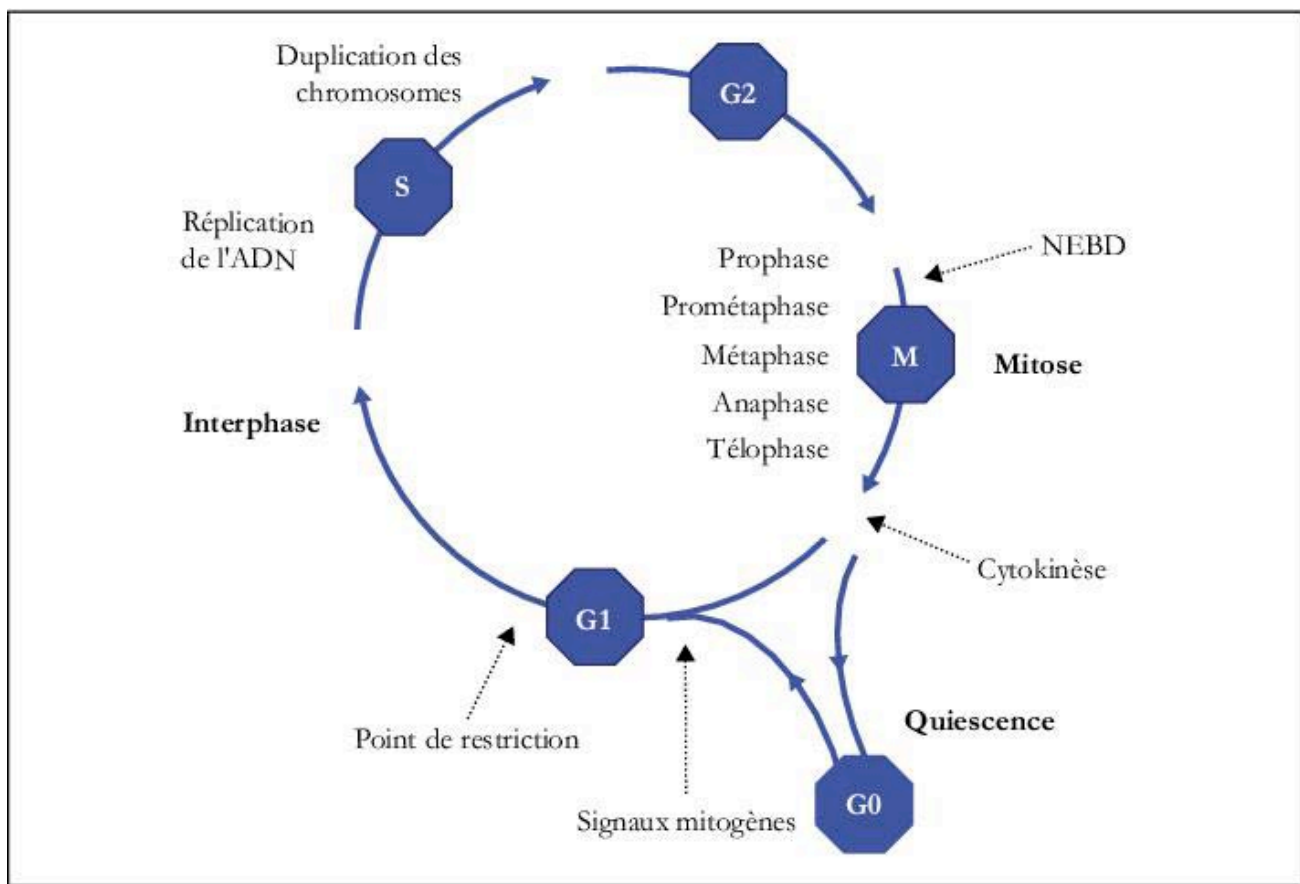


Figure 1: le cycle cellulaire, ses différentes phases avec quelques évènements cellulaires (Meijer, L. (2003).

« cycle cellulaire » comprenant quatre phases successives (G1, S, G2 et M) (Figure 1). En fait, ces quatre phases s'articulent en deux temps : l'interphase et la mitose (M ou phase de division). L'interphase regroupe les phases G1, S, et G2. Les phases G correspondent à des Gaps ou intervalles (en français), et la phase S à la synthèse de l'ADN.

La mitose est subdivisée en plusieurs sous-phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Une dernière étape de division, la C-phase (cytocinèse ou cytodierèse), marque la sortie de mitose et aboutit à la séparation physique des deux cellules filles. Ces différentes phases de division cellulaire vont donner un nombre incommensurable de cellules chez les organismes pluricellulaires. Par exemple, l'Homme adulte compte 10^{13} cellules. Et, chaque jour, un milliard de cellules sont renouvelées (revue par Meijer L., 2003). A l'opposé, les êtres unicellulaires se divisent en donnant deux organismes génétiquement identiques au premier.

Par ailleurs, il existe une période au cours de laquelle la cellule peut sortir du cycle cellulaire : c'est la phase G0 pendant laquelle la cellule est en état de quiescence. Parce que la division cellulaire est irréversible, la cellule a évidemment besoin de réunir tous les éléments et informations (signaux) nécessaires au processus biologique avant d'enclencher le cycle cellulaire. Une fois que la cellule s'engage dans le cycle cellulaire, elle suit naturellement deux voies. Soit la division aboutit à deux cellules filles identiques à la cellule mère, soit la cellule entre en apoptose ou mort cellulaire. Ce dernier phénomène, tout comme la phase G0, est absent chez les cellules cancéreuses. En fait, les cellules cancéreuses perdent la faculté de mourir ou de se différencier. Par conséquent, elles se divisent de façon anarchique et prolifèrent indéfiniment.

Les cellules passent donc successivement et de manière péremptoire par les différentes phases du cycle cellulaire. Dans la progression du cycle de division cellulaire, chaque phase sert à préparer aussi l'entrée dans la phase suivante.

1.1. Interphase : G1 ; S ; G2

L'interphase est la phase de croissance cellulaire par excellence. Elle est également la phase la plus longue du cycle cellulaire. On considère que les cellules humaines par exemple suivent un cycle cellulaire qui durent environ 24 heures dont une heure seulement occupée par la mitose. L'interphase prépare la cellule à l'entrée en mitose (transition G2/M). Elle se subdivise en trois phases successives :

La phase G1 : c'est la phase la plus longue du cycle cellulaire. C'est durant cette phase que sont synthétisés tous les facteurs de croissance et les protéines indispensables à la réplication de l'ADN ainsi qu'à la duplication des centrosomes. En outre, la phase G1 comporte un point de contrôle important : la restriction R (G1 checkpoint) qui permet à la cellule d'estimer si elle possède suffisamment de facteurs de croissance pour effectuer un cycle cellulaire entier. Une fois que cette condition est remplie et sous l'induction de signaux mitogènes, la cellule poursuit alors irrémédiablement sa progression dans le cycle pour aboutir à la division cellulaire. A défaut, elle reste en pause (G0) ou s'oriente vers la différenciation cellulaire (Pardee, 1974 ; Zavitz and Zipursky, 1997 ; Cooper, 2001).

La phase S : c'est la phase de synthèse ou de réplication de l'ADN selon un processus semi-conservatif. C'est pendant cette phase que se produit la duplication complète du matériel génétique pour donner naissance aux chromatides sœurs,

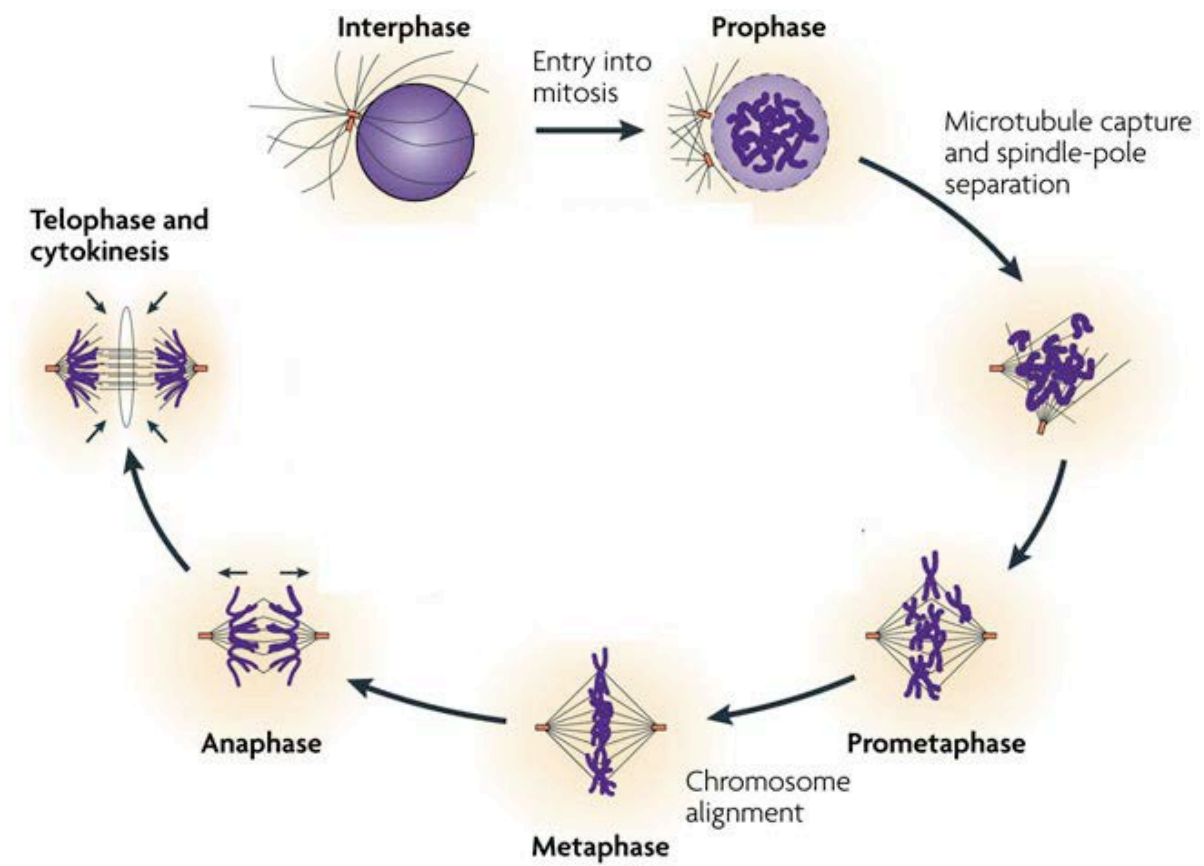


Figure 2 : les différentes phases de la mitose ainsi que quelques évènements qui se passent en début de mitose (Jackson et al., 2007).

précurseurs des chromosomes. La duplication du centrosome intervient également au cours de cette phase S. Par ailleurs, cette phase comporte également un point de contrôle qui permet un blocage de la progression de la fourche de réplication pour permettre les réparations de lésions de l'ADN. Donc, c'est une phase très importante pour la viabilité de la cellule car elle permet de prévenir l'instabilité génétique qui est une des causes du cancer. Enfin, la phase S prépare la cellule à l'entrée en phase G2.

La phase G2 : c'est la dernière phase de l'interphase. La cellule achève sa croissance et synthétise les protéines permettant l'entrée en mitose. Elle comporte encore un noyau bien délimité par une enveloppe nucléaire qui contient des chromosomes encore empaquetés. Cette phase comporte également un point de contrôle qui empêche l'entrée en mitose des cellules ayant des dommages dans l'ADN. C'est au cours de cette phase que sont activées la plupart des protéines kinases essentielles à la mitose en particulier le complexe Cycline B/Cdk1.

1.2. Mitose : Prophase ; Prométaphase ; Métaphase ; Anaphase ;

Télophase

La mitose (**Figure 2**) est la dernière phase du cycle avant la séparation physique de deux cellules filles. Elle dure environ 1 heure chez les cellules humaines. La mitose a pour fonction de séparer les chromatides sœurs en deux lots identiques qui seront hérités par chacune des deux cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère. Elle comprend :

La prophase : Le réseau de microtubules interphasiques disparaît et la cellule s'arrondit. La chromatine se condense, ce qui aboutit à la constitution de chromosomes ayant chacun deux chromatides sœurs dont l'association est assurée par des cohésines en particulier au niveau de leurs centromères. Les deux centrosomes se séparent et migrent autour du noyau pour se positionner aux pôles opposés de la cellule. Chaque centrosome nucléée des microtubules dits « mitotiques » beaucoup plus dynamiques que les microtubules interphasiques. La membrane nucléaire commence à se rompre (NEBD, nuclear envelope break down).

La prométaphase : les chromosomes finissent de se condenser, ils commencent à nucléer des microtubules qui, avec ceux émanant des centrosomes vont permettre la mise en place du fuseau bipolaire. Pendant la prométaphase, les kinétochores portés par les centromères des chromosomes s'attachent aux microtubules émanant des centrosomes. Ces mécanismes participent à la congression des chromosomes. Enfin, un mécanisme cellulaire crucial, le point de contrôle du fuseau mitotique (SAC), n'autorisera la transition métaphase-anaphase que lorsque les kinétochores de tous les chromosomes seront attachés aux microtubules et placés sous tension. Deux protéines importantes Mad2 et BubR1 sont localisées sur les kinétochores non-attachés aux microtubules et signalent à la cellule son état prométaphase en inhibant la dégradation des cohésines. Ce sont (Mad2 et BubR1) les effecteurs terminaux du point de contrôle du fuseau mitotique (SAC) (Skoufias et al., 2001; Sudakin et al., 2001, Waters et al., 1998). Chaque chromosome doit être positionné de telle sorte que chacun de ses deux kinétochores soit lié à un centrosome localisé à un pôle du fuseau. Le point de contrôle du fuseau

mitotique est actif dès l'entrée de la cellule en mitose, son inactivation entraînera la transition métaphase-anaphase.

La métaphase : cette phase est caractérisée par l'alignement des chromosomes hautement condensés sur la plaque équatoriale encore appelée « plaque métaphasique ». C'est en fait la phase la plus courte de la mitose. Elle est très furtive car les cellules en sortent aussitôt qu'elles l'atteignent. Dès que tous les chromosomes ont été correctement alignés sur la plaque métaphasique, le point de contrôle du fuseau mitotique s'éteint, l'inhibition de la dégradation des cohésines est levée, les chromatides sœurs se séparent et la cellule passe en anaphase.

L'anaphase : cette phase de la mitose est subdivisée en deux sous-phases (l'anaphase A et B). Au cours de l'anaphase A, les microtubules du fuseau se dépolymérisent et raccourcissent, entraînant la séparation des chromatides sœurs qui ne sont plus retenues par les cohésines. L'anaphase A se déroule sans que les centrosomes ne s'éloignent l'un de l'autre. C'est aussi à ce moment que se met en place le fuseau central (central spindle).

Durant l'anaphase B intervient l'élongation de nouveaux microtubules qui vont accentuer la séparation des deux lots de chromosomes et l'éloignement des deux centrosomes.

La télophase : c'est la phase terminale de la mitose. Un anneau contractile d'acto-myosine se forme entre les deux futures cellules filles, la membrane plasmique s'invagine jusqu'à former un corps intermédiaire qui sera le lieu de séparation physique des deux cellules. Les chromosomes se décondensent et

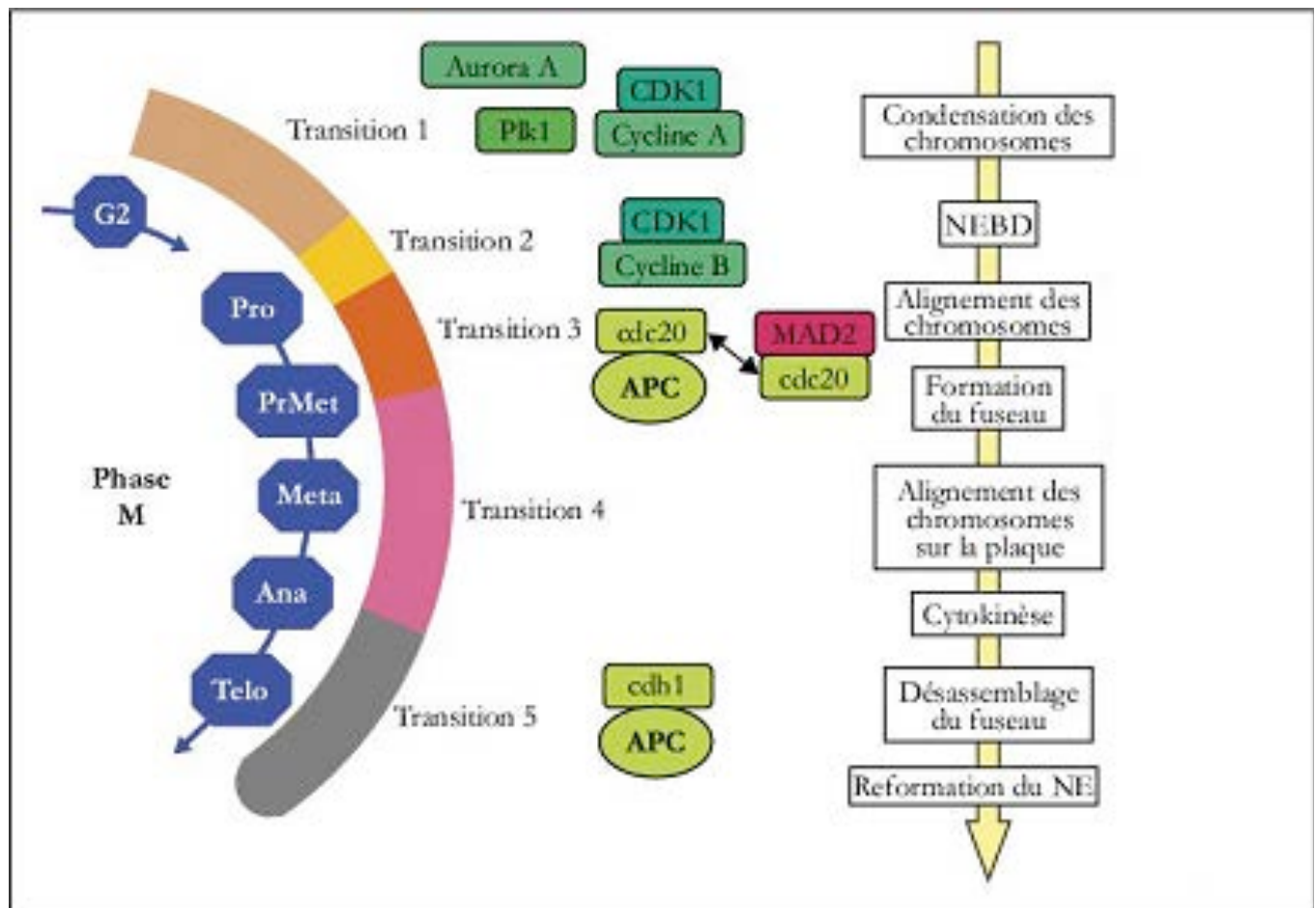


Figure 3 : correspondance entre les phases et les transitions en mitose. Meijer, L., 2003 (adapté de Pines, J. and Rieder, C.L., 2001). Cette figure présente les évènements mitotiques qui ont lieu durant chaque phase ou transition et les acteurs (protéines) qui y sont impliqués.

l'enveloppe nucléaire se reforme. Cette phase se termine par la cytokinèse ou cytotérièse, qui aboutit à la séparation physique des deux cellules filles.

Ces différentes étapes de la division cellulaire se succèdent de façon strictement rigoureuse, l'entrée dans chaque nouvelle phase ne se faisant qu'après la fin de la précédente et ce, de l'interphase jusqu'à la fin de la mitose (revue par Meijer L., 2003).

Une classification de la mitose basée sur l'activité kinase des protéines mitotiques a été proposée par Pines et Rieder en 2001. Elle se décline en cinq transitions (**Figure 3**) que voici :

Transition 1 : qui va de la fin G2 à la prophase. Elle fait intervenir les protéines kinases Cdk1/cyclineA, Plk1 et Aurora-A qui sont surtout impliquées dans l'entrée en mitose (transition G2/M) ;

Transition 2 : caractérisée par l'activation du complexe Cdk1/CyclineB par la Cdc25 et sa translocation au noyau. On assiste à la rupture de l'enveloppe nucléaire et à la condensation des chromosomes.

Transition 3 : correspond à la prométaphase. C'est à ce niveau que se déroulent bon nombre d'événements mitotiques majeurs dont, entre autres, les attachements kinétochores-microtubules, la congression et l'alignement correct des chromosomes autour de la plaque métaphasique et la mise en place du fuseau bipolaire. Tout au long de cette transition, le point de contrôle du fuseau mitotique est actif. Les kinases Aurora-A et -B et certains de leurs partenaires tels que les

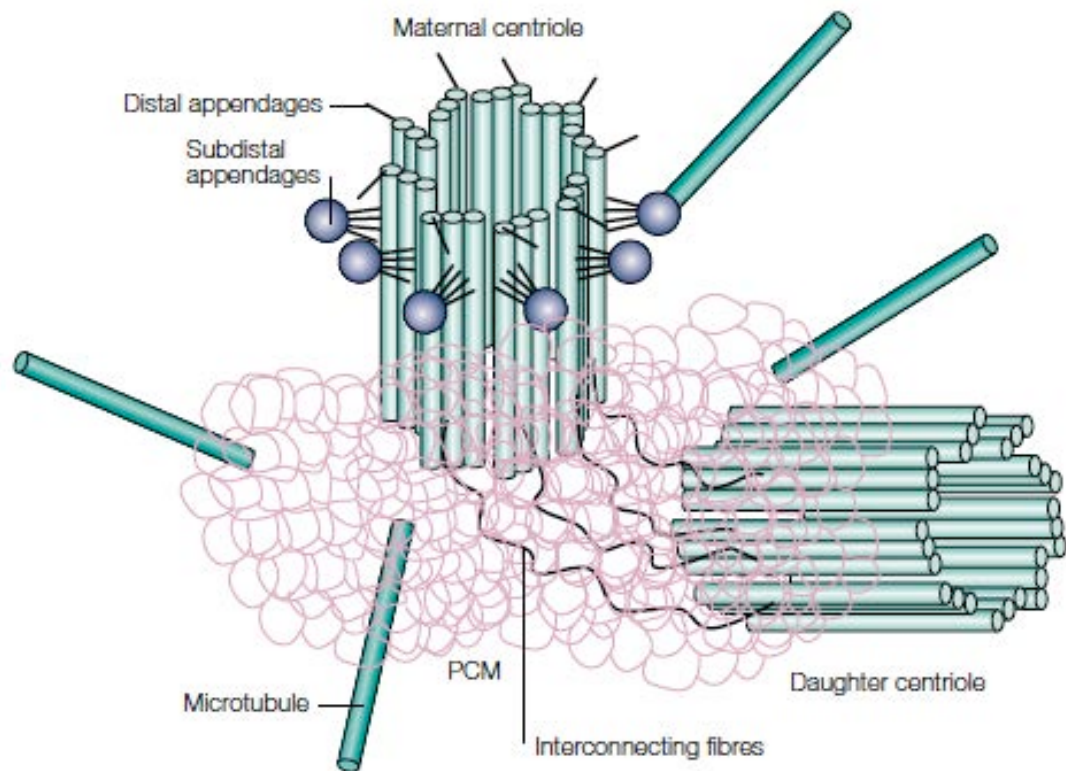


Figure 4: structure du centrosome (Doxsey, S., 2001).

Les différents constituants du centrosomes ainsi que l'interconnexion entre les centrioles maternel et fille.

protéines Mps1, Bub1 et 3, BubR1 et Mad1 et 2, jouent un rôle prééminent au cours de cette transition.

Transition 4 : caractérisée par l'activation du complexe APC/Cdc20 pour permettre la transition métaphase-anaphase. En outre, la cycline B1 se trouve dégradée pour favoriser la sortie de la mitose.

Transition 5 : c'est au cours de cette transition qu'interviennent l'inactivation de la protéine Cdk1, la reconstitution de l'enveloppe nucléaire et la cytokinèse. Par conséquent, les cellules retournent en interphase.

2. Structures et Mécanismes de la mitose

Au cours de la mitose la cellule doit fabriquer deux cellules à partir d'une seule. L'ADN, support de l'information génétique, a été préalablement dupliqué. Au cours de la mitose la cellule doit mettre en place un système mécanique qui lui permet de séparer physiquement chacune des deux copies de son information génétique pour que chacune des deux cellules filles hérite de la même information.

Ceci est assuré par le fuseau bipolaire de microtubules.

2.1. Des structures cellulaires importantes en mitose :

2.1.1. Centrosomes

Le centrosome est le principal centre organisateur des microtubules (MTOC) chez les mammifères à partir duquel sont nucléées les microtubules. Il comprend deux centrioles entourés du matériel péri-centriolaire (PCM) (Figure 4). Le centrosome se duplique au cours de l'interphase (phase S). Cette duplication du

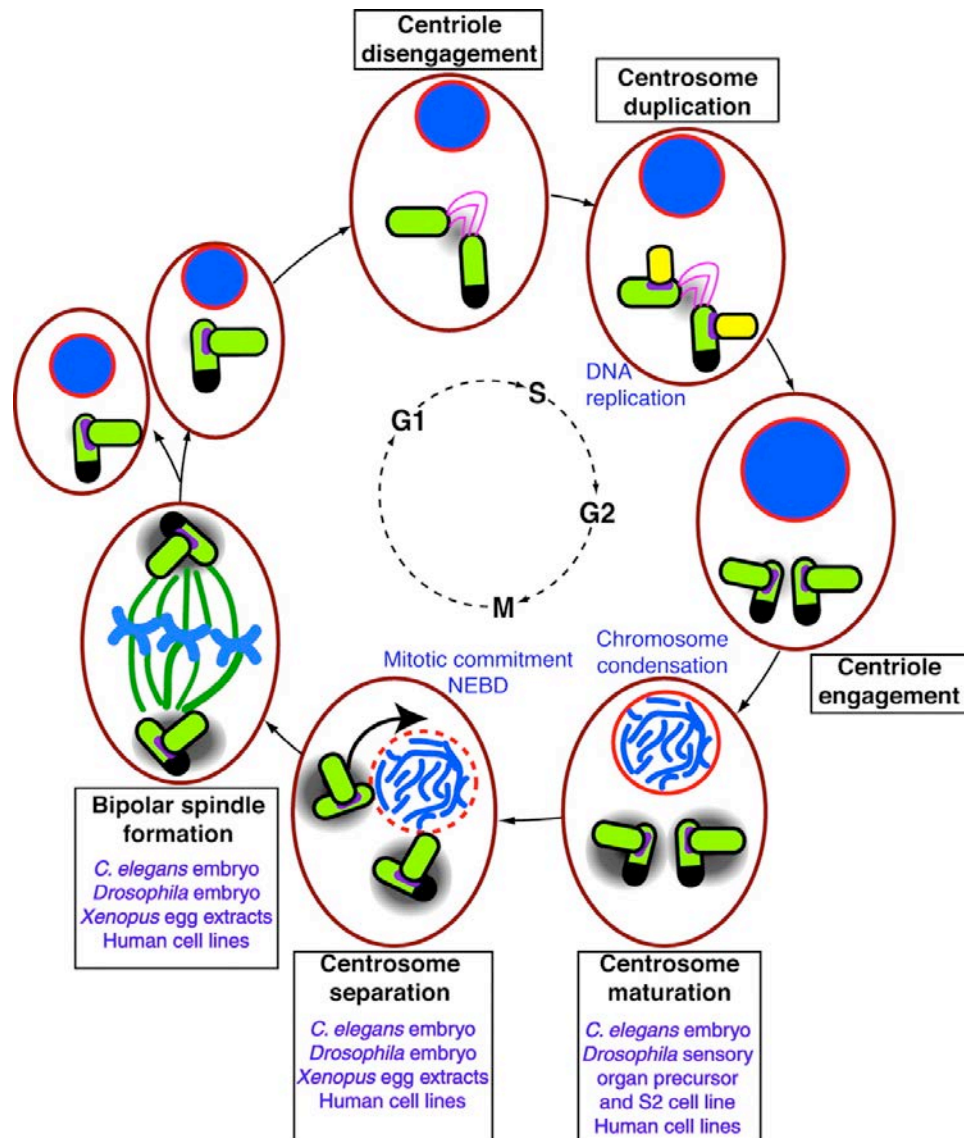


Figure 5: le cycle du centrosome et la formation du fuseau bipolaire (Barr and Gergely, 2007). Cycle de formation, de maturation et de séparation du centrosome en lien avec quelques évènements mitotiques et la formation du fuseau bipolaire.

centrosome se fait en parfaite coordination avec d'autres évènements du cycle cellulaire comme la réplication de l'ADN (Kronenwett et al., 2003 ; Paintrand et al., 1992 ; Kellogg et al., 1994 ; Sluder and Hinchcliffe, 1998). C'est aussi par exemple le complexe Cdk2-Cyclin E qui régule la réplication de l'ADN et la duplication du centrosome (Lacey et al., 1999 ; Matsumoto et al., 1999). En outre, comme la réplication de l'ADN, la duplication du centrosome ne doit avoir lieu qu'une et une seule fois par cycle pour assurer la bipolarité du fuseau mitotique, ainsi que la bonne ségrégation des chromosomes (Meraldi et al., 1999 ; Heald et al., 1997) (**Figure 5**).

Une fois dupliqués, en fin de G2 et en début de mitose les centrosomes recrutent des protéines qui vont participer à l'assemblage du fuseau bipolaire : c'est la maturation des centrosomes. Elle se caractérise par une forte accumulation de la γ -tubuline et d'autres composants du PCM. Cette augmentation de la γ -tubuline serait de l'ordre de 3 à 5 fois en fin de prophase chez les cellules des vertébrés (Khodjakhov and Rieder, 1999). Ceci confère au centrosome une capacité considérable de nucléation et d'organisation des microtubules. Plusieurs sérine/thréonine kinases sont requises pour cette maturation, comme PLK1, CDK11 et Aurora-A que nous allons étudier plus en détail (Glover et al., 1995 ; Schumacher et al., 1998 ; Hannak et al., 2001 ; Dutertre et al., 2002 ; Marumoto et al., 2002 ; Hirota et al., 2003 ; De Luca et al., 2006 ; Hoar et al., 2007 ; Lee and Rhee, 2011).

2.1.2. Microtubules

Les microtubules sont des structures tubulaires polarisées du cytosquelette qui servent au transport des organelles d'une part, et au maintien de la polarité cellulaire d'autre part. De plus, ils sont fortement impliqués dans la motilité et la division cellulaire (Nogales, 2000).

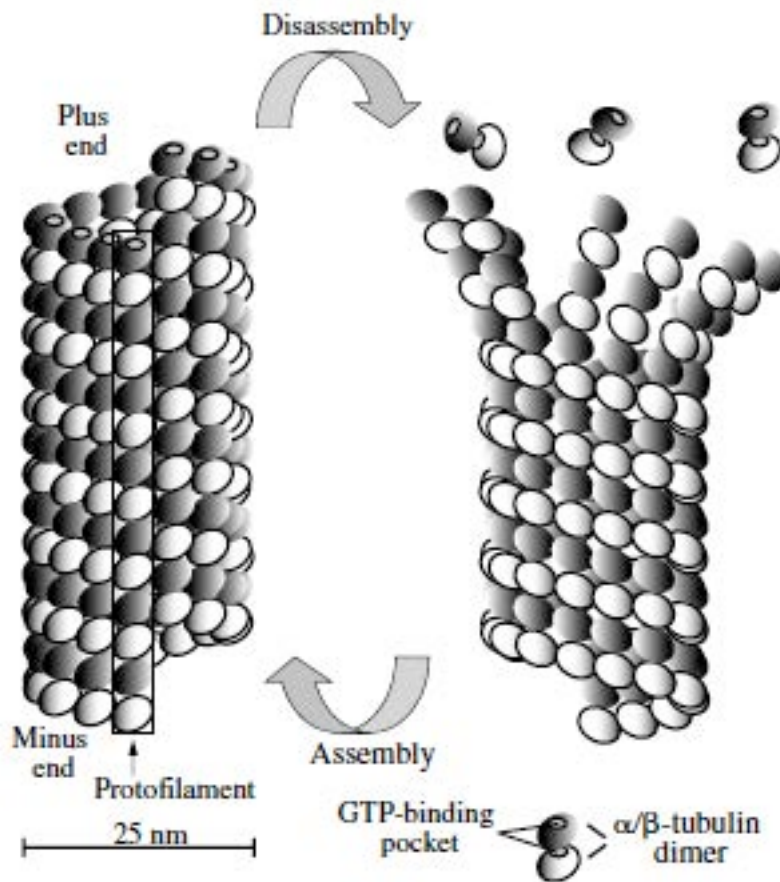


Figure 6: mécanisme d'assemblage des microtubules à partir de leurs dimères α/β -tubuline formant des protofilaments. Chaque microtubule est constitué de 12 à 15 protofilaments ayant chacun un diamètre d'environ 25nm (Wiese and Zheng, 2006).

Les microtubules sont constitués d'hétérodimères de tubuline. Chaque hétérodimère de tubuline comprend deux sous-unités : la sous-unité α -tubuline chargée négativement et la sous-unité β -tubuline chargée positivement. Elles sont reliées entre elles par des liaisons non covalentes (Figure 6). Toutefois, un autre composant de la tubuline, la γ -tubuline, joue un rôle prépondérant dans la nucléation des microtubules. La γ -tubuline est localisée dans des complexes protéiques appelés γ -tubuline ring complex (γ TuRCs) (Figure 7). Ces γ TuRCs portent les sites de nucléation des microtubules. En outre, ils contiennent plusieurs copies de γ -tubuline qui se lient aux extrémités négatives des microtubules et permettent ainsi leur nucléation (Moritz et al., 1995 ; Zheng et al., 1995 ; Moritz et al., 2000). Enfin, les γ TuRCs assemblent en leur sein de mini-complexes formés chacun de deux molécules de γ -tubuline appelés γ TuSCs (γ -tubuline small complex). Ces γ TuSCs permettraient de potentialiser l'activité de nucléation par les γ TuRCs (Kollman et al., 2010). Par ailleurs, les microtubules peuvent aussi être nucléés à partir des kinétochores en l'absence de MTOC via la chromatine et les protéines motrices (Khodjakov et al., 2000). Cette fonction de nucléation serait régulée par la Ran GTP et RCC1 (regulator of chromosome condensation 1). Il existe également d'autres acteurs protéiques impliqués dans la nucléation des microtubules. Il s'agit essentiellement des protéines associées aux microtubules telles que TACC, TPX2, TOG, de la kinésine 13 (MCAK) ou de la kinase mitotique Aurora-A.

Au cours de la progression du cycle, la cellule passe par deux phases différentes de nucléation des microtubules : l'interphase et la mitose. En interphase, les microtubules sont cytoplasmiques, très longs, peu dynamiques et définissent la forme de la cellule. D'après Moritz et al. (1995), les extrémités chargées négativement ou à croissance lente sont orientées vers le PCM tandis que celles

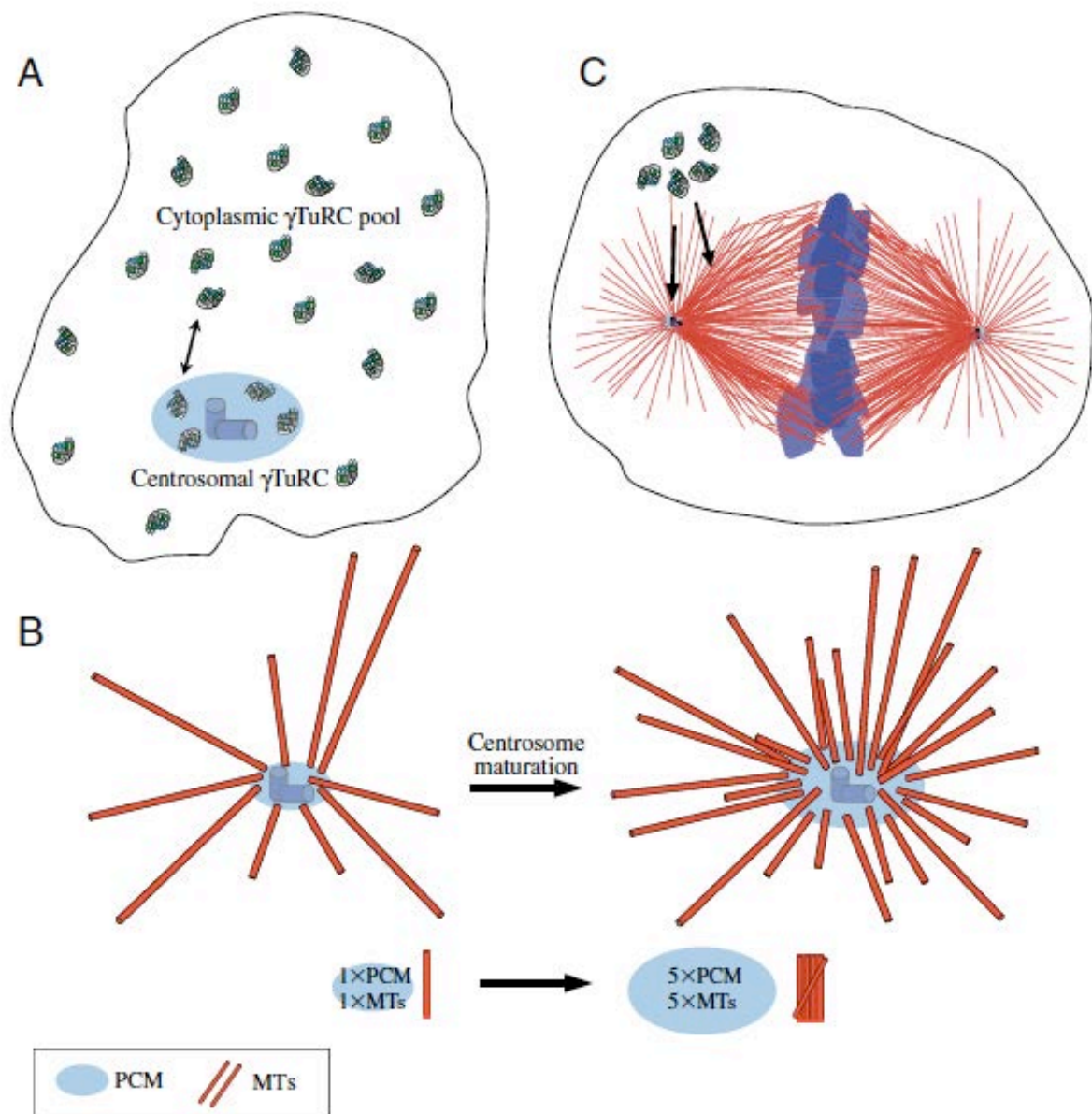


Figure 7: schéma du recrutement des γ TuRCs aux centrosomes en interphase (A), aux centrosomes mitotiques durant leur maturation en début de mitose (B) et aux centrosomes et fuseau mitotique en mitose (Wiese and Zheng, 2006).

positives ou à croissance rapide sont encrées dans le cytoplasme. Durant l'interphase, il y a un échange de la γ -tubuline du cytoplasme au centrosome. Ceci permet d'augmenter 5 fois la taille du centrosome et sa capacité de nucléation en début de mitose (Ducat and Zheng, 2004 ; Wiese and Zheng, 2006). A l'entrée en mitose, les microtubules interphasiques sont dépolymérisés et la cellule prend alors une forme sphérique. En mitose, les microtubules sont courts et très dynamiques, leur unique fonction est d'assurer la mise en place d'un fuseau bipolaire.

2.1.3. Chromosomes

Chaque chromosome mitotique est constitué de molécules d'ADN associées à des protéines de type histone. Ils portent en eux les gènes, support de l'information génétique transmise fidèlement de la cellule mère aux deux cellules filles au cours de la mitose.

Durant l'interphase, l'ADN réside dans le noyau, séparé du cytoplasme par la membrane nucléaire. Il se réplique en phase S et s'organise en chromatides sœurs associées entre elles par les cohésines.

La cohésion des chromatides sœurs s'établit lors de la réplication et se maintient jusqu'en métaphase. Cette cohésion ne disparaît que par dégradation des cohésines lorsque le point de contrôle de mitose (SAC) est satisfait, à la transition métaphase-anaphase, déclenchant la ségrégation des chromatides (Sumara et al., 2000).

La condensation des chromosomes quant à elle s'établit en fin G2 grâce au complexe de condensine et est maintenue jusqu'en télophase. La compaction maximale des chromosomes a lieu en métaphase. La décondensation des

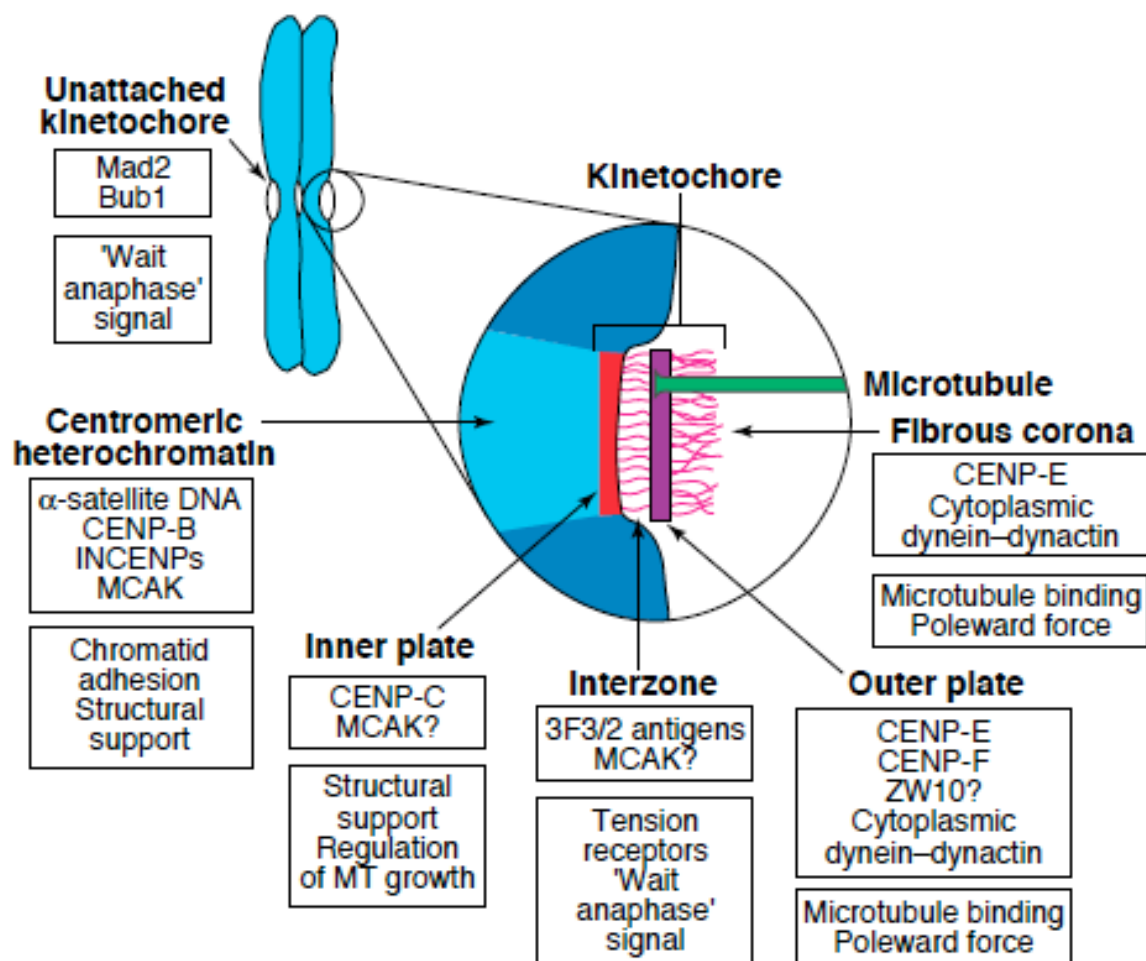


Figure 8: les structures du kinétochore et leurs fonctions ainsi que quelques constituants protéiques essentiels (Rieder and Salmon, 1998).

chromosomes se produit en fin d'anaphase, et est complète en début de cytokinèse au moment de la réformation de l'enveloppe nucléaire.

2.1.4. Kinétochores (composants du kinétochores)

Le kinétochore est une structure supramoléculaire de protéines située aux centromères des chromosomes en mitose. Chaque chromosome porte deux kinétochores, un par chromatide sœur. Le kinétochore comprend une face interne au contact du centromère et une face externe au contact des microtubules. Plus d'une centaine d'activités protéiques sont requises pour les fonctions du kinétochore. Sur sa face interne se localisent Cenp-A (centromere protein A) qui est un variant de l'histone H3 et Cenp-C, qui est la plateforme d'assemblage du kinétochore. Sur la face externe on trouve les complexes protéiques KMN (KNL1, Mis12 complex et Ndc80 complex). C'est sur cette face externe du kinétochore que se fixent les microtubules kinétochoriens (**Figure 8**). Le complexe protéique Ndc80 (Hec1)/Nuf2, qui joue un rôle majeur dans l'interaction microtubules-kinétochores (Maiato et al., 2004; DeLuca et al., 2005), constitue la plateforme d'ancrage des protéines transitoires aux kinétochores. Certaines protéines du kinétochore sont assemblées en fin G2 alors que d'autres le sont en prophase, après la rupture de l'enveloppe nucléaire (Chan and Yen, 2003). L'assemblage de ce complexe Multiprotéique transitoire (**Figure 9**) que forme le kinétochore comprend entre autres les protéines Bub1, Bub3, BuR1, Mad1, Mad2 et Mps1. S'y ajoutent également la kinésine Cenp-E qui renforce l'activité de BubR1 et Mad2, les deux principaux effecteurs terminaux du point de contrôle du fuseau mitotique. L'attachement kinétochores-microtubules est un événement-clé qui a lieu en prométaphase. En métaphase tous les kinétochores doivent être attachés et sous tension pour que la cellule déclenche la transition

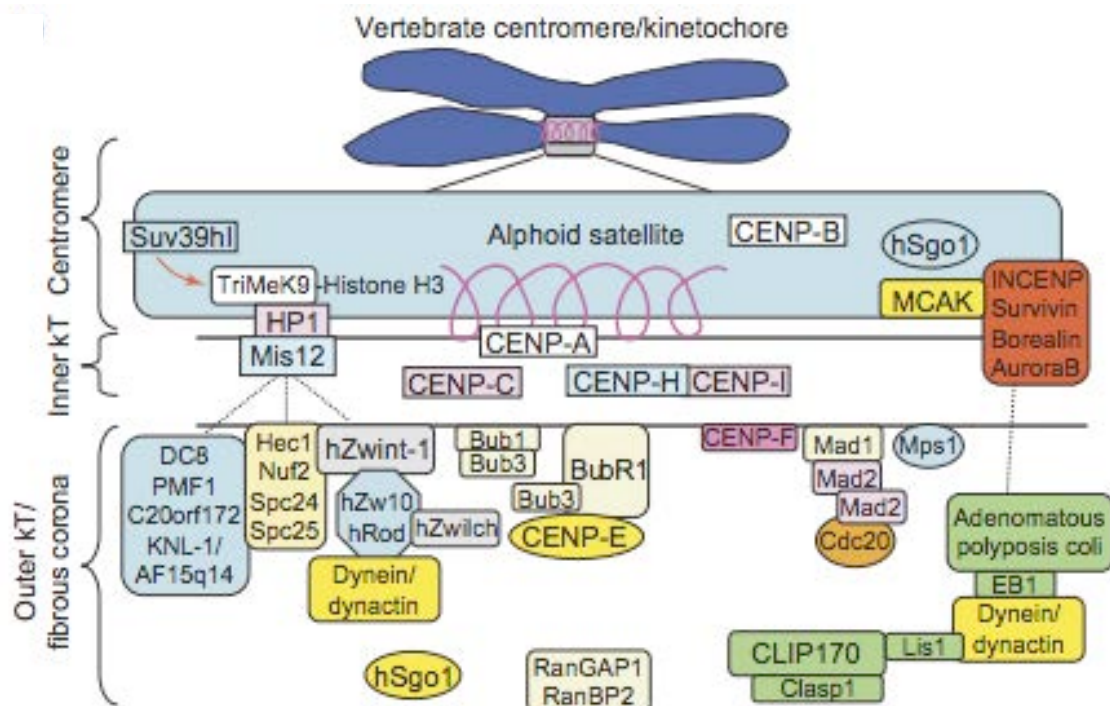


Figure 9: les composants du kinétochore (Chan et al., (2005).

Les différentes protéines impliquées dans le fonctionnement du SAC et leur localisation au centromère et sur les faces interne et externe du kinétochore.

métaphase–anaphase et donc la ségrégation des chromosomes (Biggins et Walczak, 2003; Cleveland et al., 2003; Hauf et Watanabe, 2004; Maiato et al., 2004; Christopher et al., 2005). L'attachement kinétochores-microtubules est constamment analysé par la cellule en prométaphase. Les kinétochores non attachés émettent un signal négatif vers la machinerie de dégradation des protéines (en particulier des cohésines) empêchant les cellules de passer en anaphase (Campbell et Gorbsky, 1995; Li et Nicklas, 1995; Rieder et al., 1995). Ce signal est assuré par les effecteurs terminaux du point de contrôle du fuseau bipolaire, Mad2 et BubR1. Ce mécanisme assure une ségrégation équitable des chromatides entre les deux cellules filles durant l'anaphase (Musacchio et Hardwick, 2002; Taylor et al., 2004).

Le fuseau bipolaire

Le fuseau bipolaire est une structure mitotique microtubulaire temporaire et dynamique. Il est construit progressivement en prométaphase pour atteindre sa forme finie en métaphase. Un fuseau mitotique possède plusieurs types de microtubules (**Figure 10**). Il y a les microtubules kinétochoriens qui relient les kinétochores des chromosomes aux centrosomes ; les microtubules astraux qui ancrent les centrosomes au cortex de la cellule et enfin, les microtubules polaires qui partent des centrosomes vers le pôle opposé (Osborn and Weber, 1976 ; Zheng et al., 1995 ; Doxey, 2001 ; Bornens, 2002) (Dogterom et al., 1996, Khodjakov et al., 2000 ; Carazo-Salas and Karsenti, 2003).

La dynamique des microtubules est régulée par des protéines associées aux microtubules (MAP). A leurs extrémités certaines protéines stabilisent les microtubules permettant leur polymérisation tandis que d'autres les déstabilisent induisant ainsi leur dépolymérisation. On parle alors de « la stabilité dynamique du

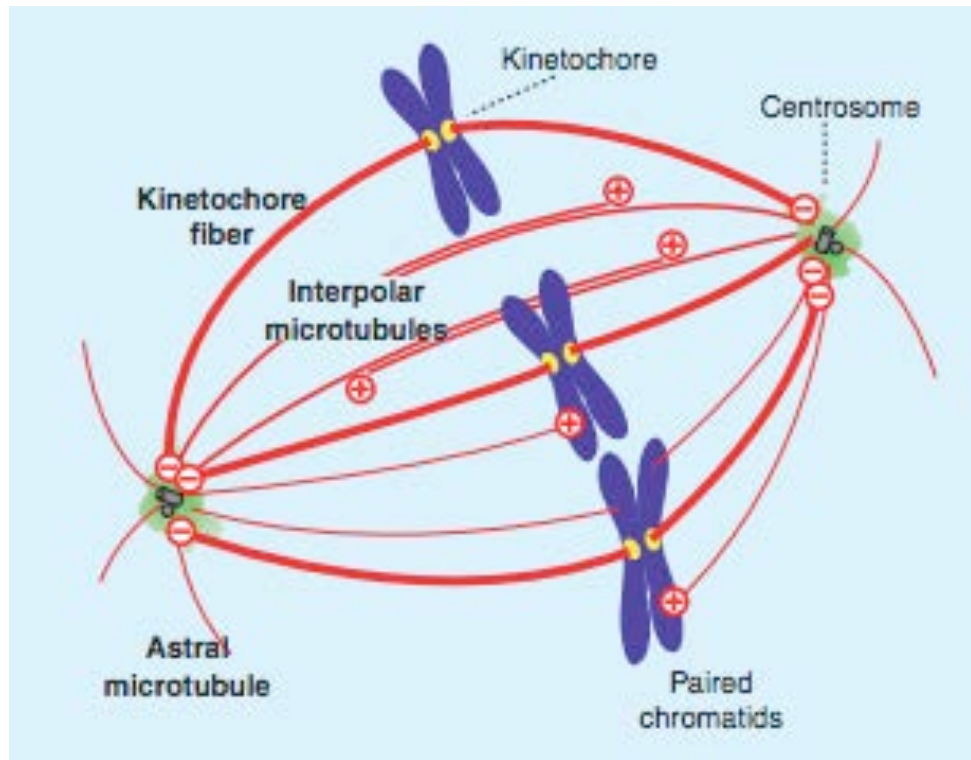


Figure 10: les différents types de microtubules et le fuseau bipolaire (Gadde and Heald, 2004). Le fuseau bipolaire est constitué des microtubules astraux, polaires et kinétochoriens.

fuseau bipolaire » pour traduire l'équilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules. D'autres MAP, en l'occurrence les kinésines, sont des protéines motrices qui se déplacent sur les microtubules. Ces protéines peuvent relier les microtubules entre eux ou transporter un cargo. Elles participent à la stabilité dynamique du fuseau en maintenant les microtubules en elles pendant leurs phases de polymérisation-dépolymérisation. C'est cette dynamique des microtubules qui joue un rôle critique dans l'alignement des chromosomes et la génération de la tension dans le fuseau mitotique (Zhou et al., 2002a et 2002b).

Cependant, certaines substances appelées poisons des microtubules permettent de bien se rendre compte de l'équilibre dynamique dans lequel se trouve le fuseau. Ces substances détruisent le fuseau mitotique soit en stabilisant les microtubules (Taxol par exemple) soit en déstabilisant les microtubules (Nocodazole par exemple). Ces deux phénomènes concourent d'ailleurs à maintenir le point de contrôle du fuseau (SAC) actif, empêchant ainsi les cellules de sortir de l'état « prométaphase ».

Par contre, dès que la métaphase est atteinte, le SAC est satisfait et le fuseau joue son rôle immédiatement en séparant les chromatides sœurs pendant l'anaphase. Durant l'anaphase A débute la séparation des chromatides sœurs et la formation du fuseau central (central spindle) qui est le prolongement des microtubules polaires. Au cours de l'anaphase B, il y a élongation du fuseau central et migration des chromatides aux pôles opposés.

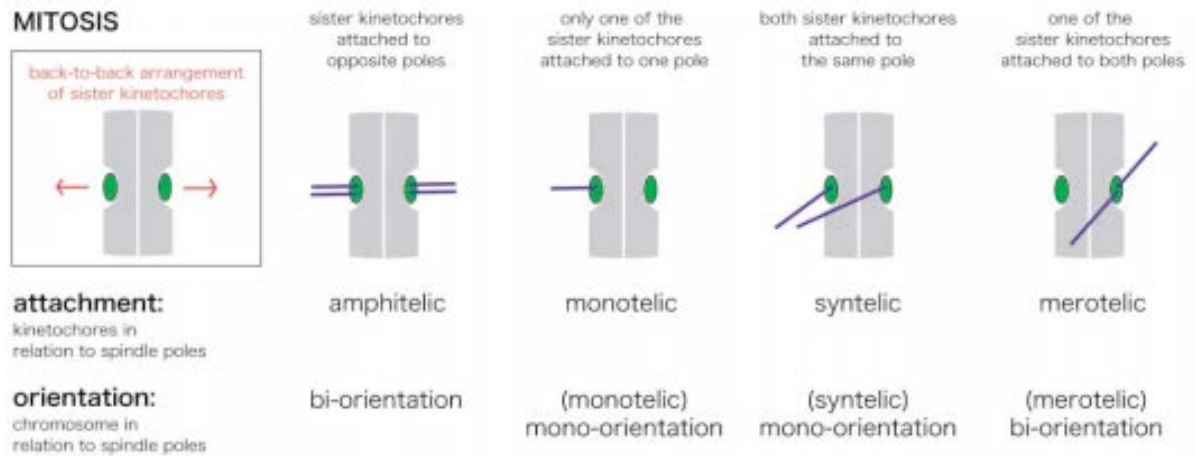


Figure 11: Attachement et orientation des attachements kinétochores-microtubules (Hauf and Watanabe, 2004). Différentes interactions entre le kinétochoire et les microtubules. L'attachement amphitélisque (bi-orienté) est le mode normal d'attachement des kinétochores aux microtubules.

2.2. Des évènements cruciaux en mitose

2.2.1. Attachements kinétochores-microtubules

Les attachements kinétochores-microtubules interviennent en prométaphase. Ils permettent d'assurer la bipolarité du fuseau mitotique en métaphase en alignant tous les chromosomes autour de la plaque métaphasique. Par ailleurs, il existe différents types d'attachements. Tous les attachements monotéliques (mono-orientés), mérotéliques (les microtubules des deux pôles qui attachent le même kinétochore) et syntéliques (les microtubules d'un même pôle qui attachent les deux kinétochores sœurs) constituent des défauts d'attachement. Seuls les attachements amphitéliques (bi-orientés) sont normaux (Figure 11).

Ces attachements amphitéliques sont indispensables pour une ségrégation correcte des chromatides sœurs en anaphase.

L'interaction microtubule-kinétochore se ferait suivant un mécanisme dit de recherche et capture "search and capture" (Kirschner et Mitchison, 1986 ; Figure 12). En fait, pendant la prométaphase, le kinétochore d'une chromatide est initialement capturé par un seul microtubule provenant d'un des pôles du fuseau mitotique (un centrosome), le chromosome est alors transporté vers ce pôle par le microtubule. Ensuite, un microtubule émanant du pôle opposé du fuseau mitotique (de l'autre centrosome) vient interagir avec le kinétochore de l'autre chromatide sœur sur le même chromosome. Chaque kinétochore se trouve ainsi attaché par un microtubule émanant de chaque centrosome d'où la bi-orientation (Tanaka et al., 2005; Tanaka, 2008). Cependant, chez les mammifères ce sont plusieurs microtubules qui attachent chaque kinétochore (entre 10 et 20).

Par ailleurs, la kinésine mitotique associée au centromère (MCAK, Wordeman and Mitchison, 1995) serait requise dans l'élasticité des centromères. Une déplétion

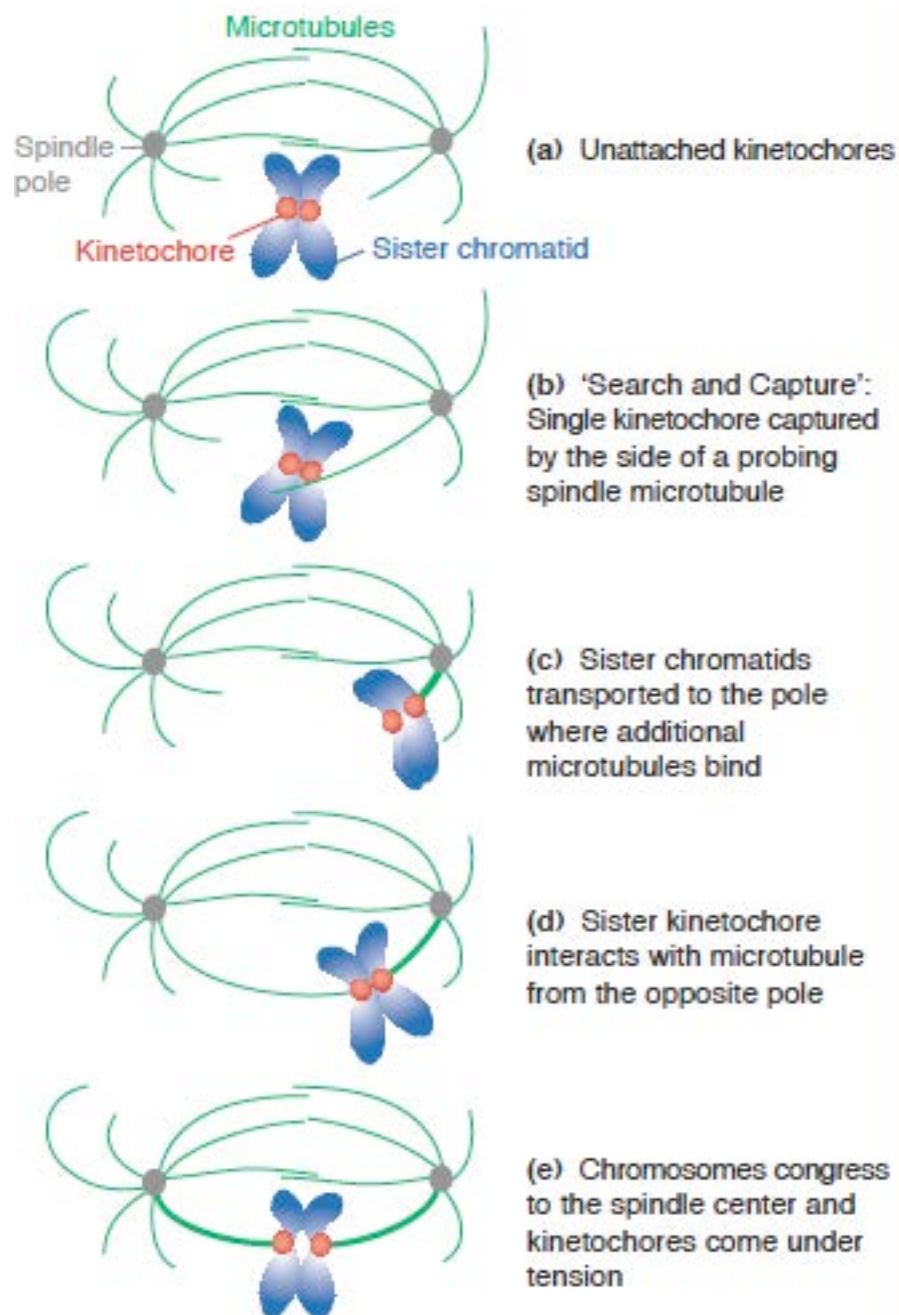


Figure 12: processus de capture et d'attachement bipolaire. (Pinsky and Biggins, 2005). Modèle d'attachement des kinétochores aux microtubules par le système recherche et capture.

de MCAK par injection d'un dominant négatif de la protéine en prophase chez la levure retarde la congression des chromosomes en induisant de multiples défauts d'attachement kinétochores-microtubules (mérotélique, synhélique ou la combinaison des deux). Par conséquent, la protéine motrice MCAK semble bien requise pour prévenir et/ou corriger les anomalies des attachements kinétochores-microtubules (Kline-Smith et al., 2004).

De même, plusieurs études ont montré que les kinases mitotiques de la famille Aurora sont fortement impliquées non seulement dans la régulation des attachements kinétochores-microtubules mais aussi dans la correction de leurs défauts. Nous aborderons ces détails dans les chapitres suivants.

2.2.2. Congression des chromosomes

La congression des chromosomes intervient en prométaphase. Elle contribue à stabiliser les attachements kinétochores-microtubules. De ce fait, elle est requise pour permettre un alignement normal des chromosomes autour de la plaque métaphasique (Tanaka et al., 2005).

Dans des cellules humaines, les kinases mitotiques Aurora-A et -B ainsi que certains de leurs partenaires seraient fortement impliqués dans la régulation de la congression. Ainsi, on note d'ailleurs une coopération très utile entre la kinase Aurora-B avec la kinésine motrice Cenp-E (kinésine-7). La protéine Cenp-E facilite le glissement latéral des chromatides sur les fibres kinétochoriennes, tandis qu'Aurora-B détache les attachements kinétochores-microtubules mono-orientés. Ceci permettrait une bi-orientation efficiente des chromosomes (Maia et al., 2010). De plus, cette congression des chromosomes autour de la plaque métaphasique interviendrait avant la bi-orientation du fuseau polaire (Kapoor et al., 2006).

Toutefois, la capacité de Cenp-E à promouvoir la congression des chromosomes mono-orientés et, en particulier, les chromosomes polaires dépendrait de sa phosphorylation sur sa thréonine 422 par les kinases mitotiques Aurora-A et -B (Kim et al., 2010). En outre, le rôle de Cenp-E dans la congression des chromosomes nécessiterait aussi la protéine motrice de la famille des kinésines : la kinésine-8 (Kif18A). La protéine Kif18A régulerait partiellement en amont l'activité de Cenp-E car les défauts de congression observés après déplétion de Cenp-E sont beaucoup plus importants dans des cellules HeLa (Huang et al., 2009). Ces mêmes auteurs ont observé que la déplétion de Kif18A occasionnerait à hauteur de 50% des cellules des problèmes d'alignements des chromosomes. Auparavant, il avait été démontré que Kif18A était requise pour la congression des chromosomes durant la mitose. En effet, Kif18A régulerait le positionnement du fuseau mitotique en contrôlant l'amplitude des oscillations des chromosomes (Luboshits and Benayahu, 2005 ; Zhu et al., 2005 ; Stumpff and Wonderman, 2007 ; Stumpff et al., 2008).

Par contre, chez la levure, la congression des chromosomes serait particulièrement régulée par les protéines motrices de la famille des kinésine-5, Cin8p et Kip1p. Ces deux protéines désassembleraient les longs microtubules kinétochoriens. Et, parmi ces deux protéines, Cin8p serait l'effecteur majeur (Gardner et al., 2008). Tout défaut observé au niveau de la congression induirait inéluctablement un délai en prométaphase. Ceci a comme conséquence de prolonger l'activité du point de contrôle du fuseau mitotique (SAC).

2.2.3. Point de contrôle de la mitose (SAC ou KAC)

En mitose, les cellules mettent en place un mécanisme cellulaire qui leur permet de s'assurer que la division cellulaire se passe correctement et aboutisse à

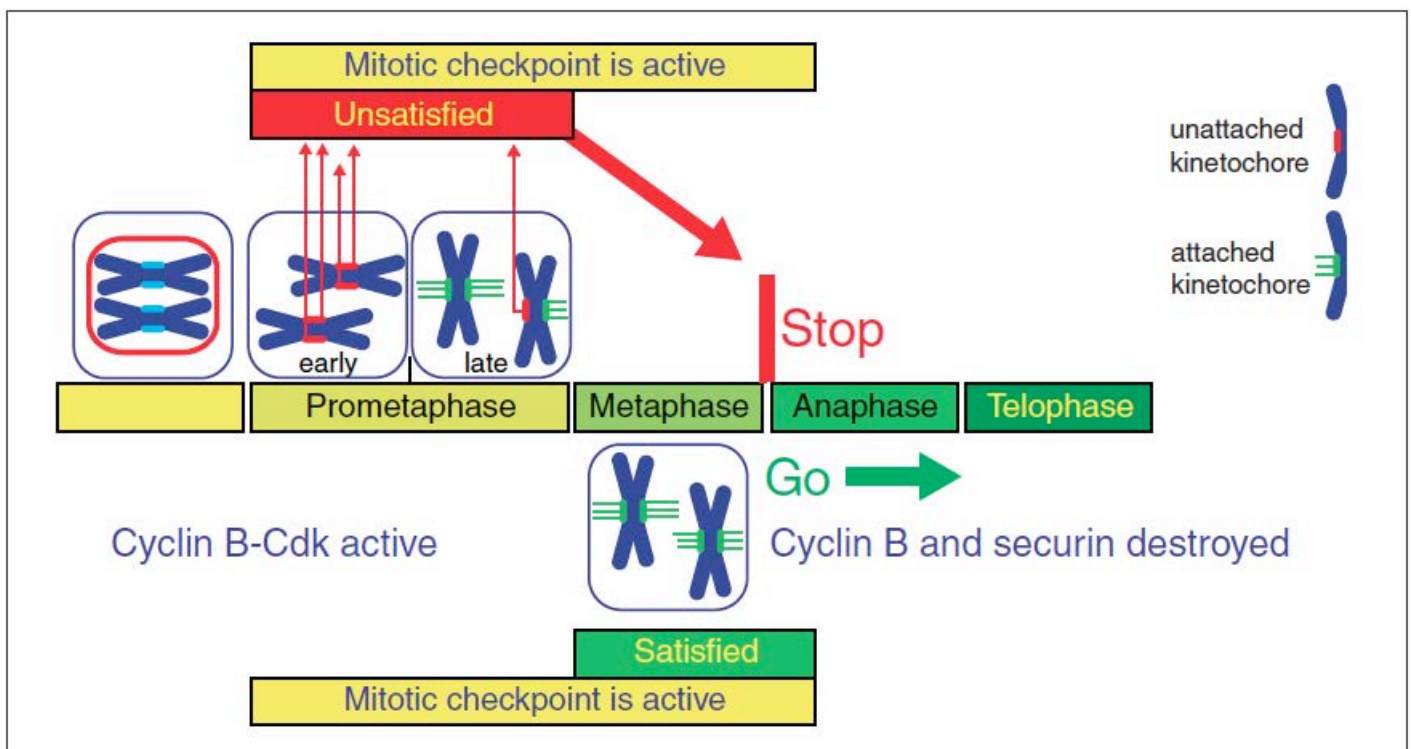


Figure 13: Mécanisme d'action du point de contrôle de la mitose (Khodjakov and Rieder, 2009). Durant la division cellulaire, le complexe Cdk1-Cycline B maintient les cellules en mitose. Pendant la prométaphase, les kinétochores libres émettent un signal qui met le point de contrôle de la mitose en situation d'insatisfaction. Au cours de la métaphase, tous les kinétochores sont attachés aux microtubules et alignés sur la plaque métaphasique. Ceci rend le point de contrôle de la mitose satisfait et permet la progression des cellules en anaphase. Pendant l'anaphase, la cycline B et la sécurine sont détruites pour permettre la sortie de mitose.

deux cellules filles identiques génétiquement. Ce mécanisme cellulaire a été dénommé SAC (spindle assembly checkpoint) par Murray (1994), KAC (kinetochore attachment checkpoint) par Rieder et al. (1994), chromosome distribution checkpoint par Nicklas (1997). Plus communément appelé SAC, le point de contrôle de la mitose (ou point de contrôle du fuseau mitotique) permet à la cellule de faire une ségrégation correcte de ces chromosomes en anaphase et empêcher ainsi l'aneuploïdie. Le point de contrôle du fuseau mitotique est systématiquement actif dès l'entrée en mitose et ce jusqu'à la fin de la prométaphase. Ainsi, il induit un délai dans la progression de la mitose pour permettre de corriger les erreurs d'attachement kinétochores-microtubules et les défauts d'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale (ou métaphasique).

Le mécanisme d'action du point de contrôle de la mitose est la détection de la présence de chromosomes dont les kinétochores ne sont pas attachés aux microtubules du fuseau mitotique. Ces kinétochores libres déclenchent une cascade de signalisation qui empêche l'activation de l'APC et ainsi la séparation des chromosomes et, par conséquent, la sortie de mitose. Dès lors que tous les kinétochores sont attachés aux microtubules le point de contrôle devient satisfait et permet alors l'activation de l'APC pour induire la sortie de mitose (Figure 13). Cependant, la satisfaction du point de contrôle de la mitose ne l'élimine pas de la cellule. Il devient simplement silencieux et entre en veille pour réimposer aussitôt un nouveau blocage (arrêt) dans la progression de la mitose s'il survenait la libération d'un seul kinétochore (Figure 14) (Khodjakov and Rieder, 2009). Cette libération de kinétochore intervient par exemple dans le cadre de la correction des erreurs d'attachement kinétochores-microtubules, en particulier synthéliques et mérotéliques, par la kinase Aurora-B et faisant également intervenir la kinésine 13, MKAC, un

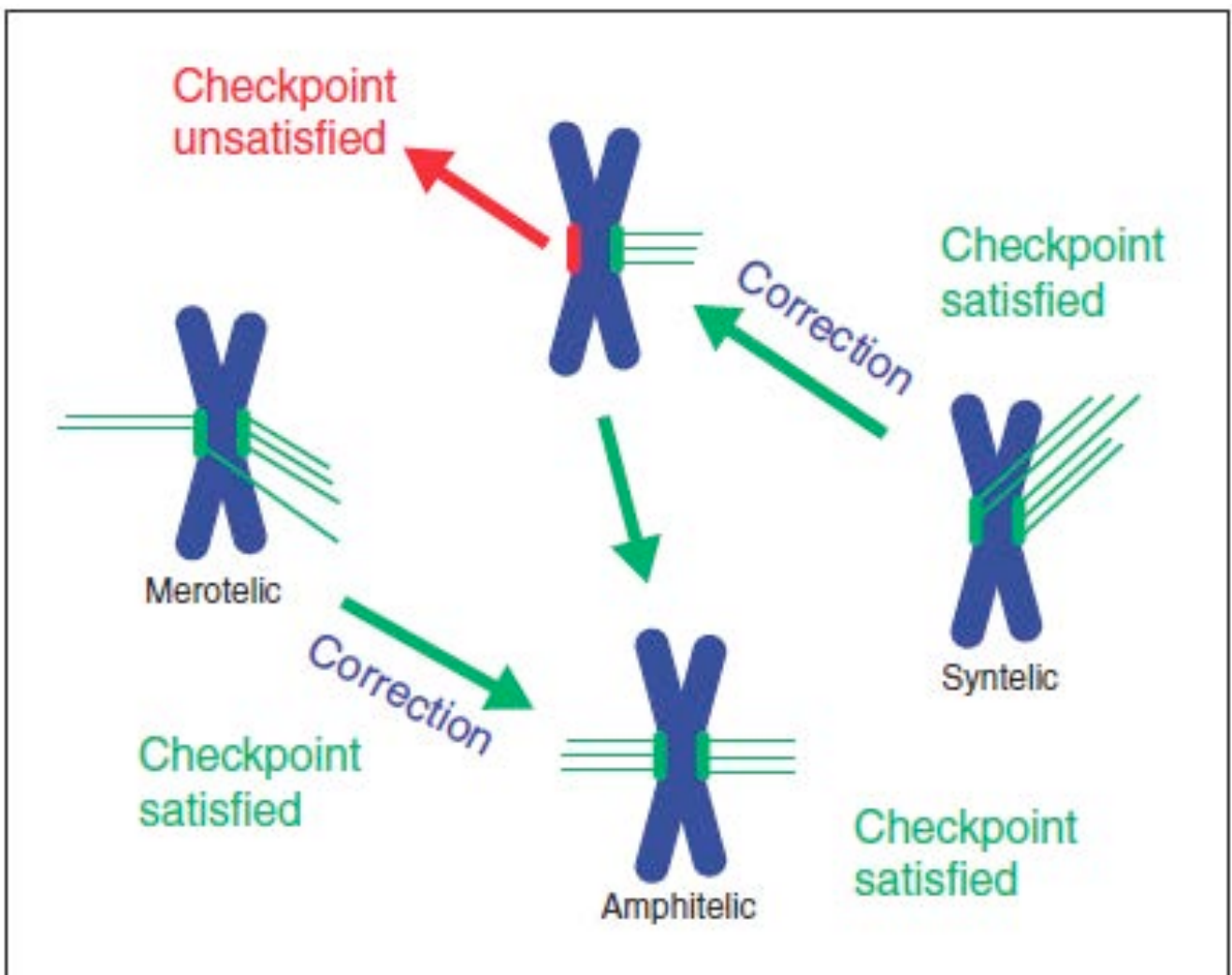


Figure 14 : Remise en service du point de contrôle de la mitose par la correction des attachements (Khodjakov and Rieder, 2009). La correction des erreurs d'attachement kinétochores-microtubules génère de nouveau des kinétochores libres. Ces kinétochores libres sont ainsi détectés par le point de contrôle de la mitose.

substrat commun aux kinases Aurora-A et -B qui dépolymérise les microtubules (Tanaka et al., 2002 ; Cimini et al., 2003 ; Kline-Smith et al., 2004 ; Lan et al., 2004 ; Tanaka et al., 2005 ; Cimini et al., 2006 ; Knowlton et al., 2006 ; Cimini D., 2007 ; Ruchaud et al., 2007 ; Tanaka T.U., 2008 ; Tanaka and Hirota, 2009 ; Tanaka, 2010). En effet, le point de contrôle de la mitose n'est pas capable de faire la distinction entre un attachement normal et un attachement incorrect des kinétochores-microtubules (Khodjakov and Rieder, 2009) (**Figure 14**).

Par ailleurs, l'activité du SAC fait intervenir plusieurs protéines dont les gènes ont été identifiés pour la première fois suite à un crible génétique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* avec des mutants dont le SAC n'était pas fonctionnel malgré l'utilisation de poisons des microtubules. Il s'agit de Mad (mitotic arrested deficiency) 1, 2 et 3 (Lee and Murray, 1991), Bub (budding uninhibited by benzimidazole) 1 et 3 (Hoyt et al., 1991). Par la suite, d'autres études ont permis d'identifier les homologues de ces gènes chez *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus* et *Homo sapiens* (Musacchio and Hardwick, 2002). Toutefois, BubR1 (Bub1 related kinase) qui est l'équivalent de Mad3 chez *Xenopus laevis*, *Mus musculus* et *Homo sapiens* a été identifié par Jablonski et al. (1998) ; Taylor et al. (1998) et Chen et al. (2002). Enfin d'autres composants du SAC, tels que Mps1 (monopolar spindle 1), Aurora-B, Cdc20, les protéines du complexe RZZ (rod, zwint-1, zw10) ont été identifiés (**Tableau 1**).

❖ **Mad2 aux kinétochores**

La protéine Mad2 s'accumule aux kinétochores non attachés aux microtubules (Chen et al., 1996 ; Waters et al., 1998). Cependant, c'est la protéine Mad1 qui recrute Mad2 aux kinétochores (Chen et al., 1998). Par contre, l'activation du SAC

Drug/concentration	MTs	Duration of mitosis \pm SD (N) ^b	Approximate hours in mitosis ^c	Survival %
Control	+	18 \pm 3 (33)	0.3	100
3.2 μ M nocodazole	–	1,140 \pm 732 (25)	19	71
250 nM colcemid	–	1,303 \pm 362 (24)	22	60
25 nM vinblastine	–	1,784 \pm 602 (24)*	30	26
1 μ M vinblastine	–	1,820 \pm 530 (37)	30	21
1 μ M maytansine	–	1,558 \pm 407 (50)	26	50
500 nM taxol	+	744 \pm 399 (117)	12	81
5.0 μ M S-Trityl-L-cysteine ^d	+	1,179 \pm 310 (160)	20	84
2.5 μ M dimethylenastron ^e	+	1,218 \pm 424 (241)	20	80
50 nM nocodazole	+	153 \pm 58 (200)	3	100
5 nM vinblastine	+	234 \pm 140 (180)	4	95
5 nM taxol	+	161 \pm 85 (171)	3	99

*Minutes from first frame after NEB to first frame including the initial signs of cytokinesis and/or telophase membrane blebbing [in cells that exited mitosis].

^bN = total numbers of cells [pooled from ≥ 2 separate long-term recordings obtained on different days].

^cMean duration of mitosis in hours.

^dPercentage of cells that exited mitosis (versus dying in mitosis).

^eThese data are from a single experiment.

^fAn Eg5 inhibitor [and nonnatural derivative of the α -amino acid cysteine].

^gAn Eg5 inhibitor [a new monastrol analogue].

Tableau 1 : Cinétique de survenue du glissement mitotique (Brito, et al., 2008).

Le glissement mitotique varie en fonction du type de poison des microtubules ainsi que de la dose administrée (concentration).

par la voie de signalisation Mad2 requiert sa dissociation avec Mad1 pour former un complexe avec Cdc20 (Chung and Chen, 2002). Par ailleurs, la diminution de la tension suite au traitement des cellules PtK1 par le taxol n'induirait pas une la localisation de Mad2 aux kinétochores (Waters et al., 1998). Cependant, l'accumulation de Mad2 aux kinétochores deviendrait indétectable après la congression des chromosomes (Shannon et al., 2002).

La protéine Cdc20 est la cible des protéines du SAC au niveau du complexe APC/C pour son inactivation par la formation de complexes Mad2-Cdc20 et BubR1-Cdc20 (Fang et al., 1998 ; Howell et al., 2000 ; Skoufias et al., 2001 ; Tang et al., 2001 ; Fang et al., 2002) (**Figure 15**). Toutefois, il semble que c'est BubR1 en premier qui se lie à Cdc20 ce, depuis la phase G2 par la formation d'un complexe BubR1-Bub3-Cdc20 (Fang et al., 2002 ; Tipton et al., 2011a). Cette interaction permettrait de renforcer la liaison entre Mad2 et Cdc20 (Fang et al., 2002 ; Shannon et al., 2002). En outre, le complexe BubR1-Bub3-Cdc20 incorporerait sélectivement la forme fermée de Mad2 durant la mitose (Tipton et al., 2011a). Enfin, il semblerait que Mad2 et BubR1 forment deux branches d'une même voie de signalisation du SAC (Shannon et al., 2002).

❖ **Délocalisation de Mad2 aux kinétochores**

Par ailleurs, le maintien des protéines du SAC aux kinétochores nécessiterait l'inactivation du complexe Dynéine/Dynactine. Ce complexe éteint le SAC en transportant ses protéines et complexes protéiques, en l'occurrence Mad2 et ses complexes, aux pôles du fuseau mitotique pour être dissociés et dégradés dans le cytoplasme (Howell et al., 2001) (**Figure 16**). Ces deux protéines sont des kinésines motrices dont le moteur moléculaire est la sous-unité de la Dynactine, P150Glued. Il

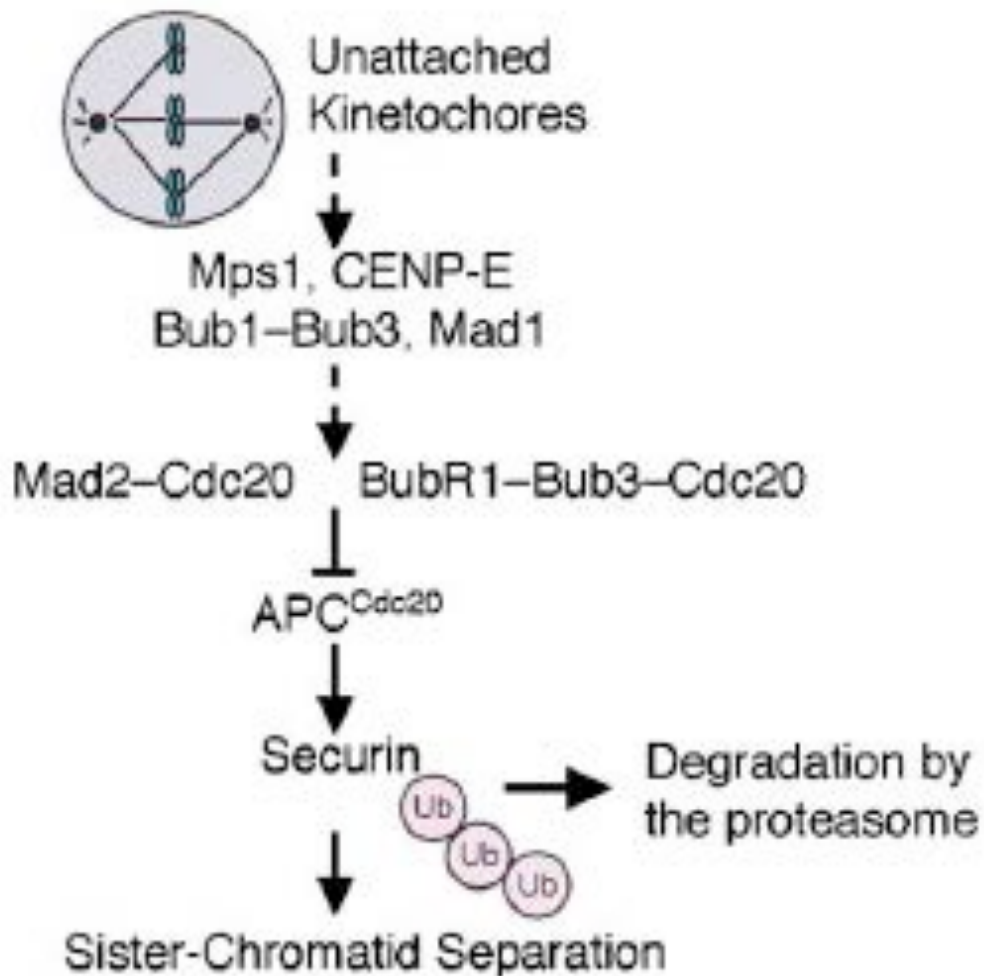


Figure 15 : modèle d'inactivation de l'APC/C par les protéines du SAC (Tang et al., 2001).

Les protéines Mad2 et BubR1 sont recrutées au niveau d'un kinétochore libre. Elles forment des complexes séparément avec Cdc20 pour inhiber l'APC et empêcher ainsi la dégradation de la securine et la séparation des chromatides sœurs.

a été montré dans notre laboratoire que P150Glued est un substrat de la kinase Aurora-A durant la mitose (Romé et al., 2010 ; Reboutier et al., 2013). En outre, Reboutier et al. (2013) ont montré que la phosphorylation de P150Glued par Aurora-A sur sa sérine 19 serait requise pour l'anaphase dans les cellules U2OS que nous avons utilisé durant ma thèse. Par conséquent, il serait intéressant de voir si l'activité kinase Aurora-A est impliquée dans le fonctionnement du point de contrôle de la mitose. Nous avons abordé ce point dans le chapitre 4.

2.2.3.1. Complexe du point de contrôle de la mitose

Les kinétochores non attachés ou mal attachés ou qui ne sont pas sous tension émettent des signaux qui bloquent l'entrée en anaphase en inhibant l'APC/C, une ubiquitine ligase E3. En effet, la sortie de mitose est enclenchée dès l'anaphase par l'activation de l'APC (anaphase promoting complexe), une sous-unité de l'ubiquitine ligase E3. Cette activation est l'œuvre de la protéine Cdc20. Une fois activée, l'APC promeut la dégradation cycline B. De même, la securine qui maintient ensemble les chromosomes mitotiques en métaphase est également ciblée par l'APC pour dégradation (**Figure 13**) (Khodjakov and Rieder, 2009). Ces signaux sont générés en particulier par Mad2 et BubR1. La voie de signalisation de Mad2 active le SAC en réponse à un défaut d'attachement kinétochores microtubules tandis que celle de BubR1 agit en réponse à une baisse de la tension (**Figure 17**) (Pinsky and Biggins, 2005). Cependant, Mad2 et BubR1 ne sont que les effecteurs terminaux du SAC. Ces deux protéines sont recrutées au kinétochores et activées par Bub1. De plus, pour être actives aux kinétochores, elles agissent sous forme de complexes protéiques.

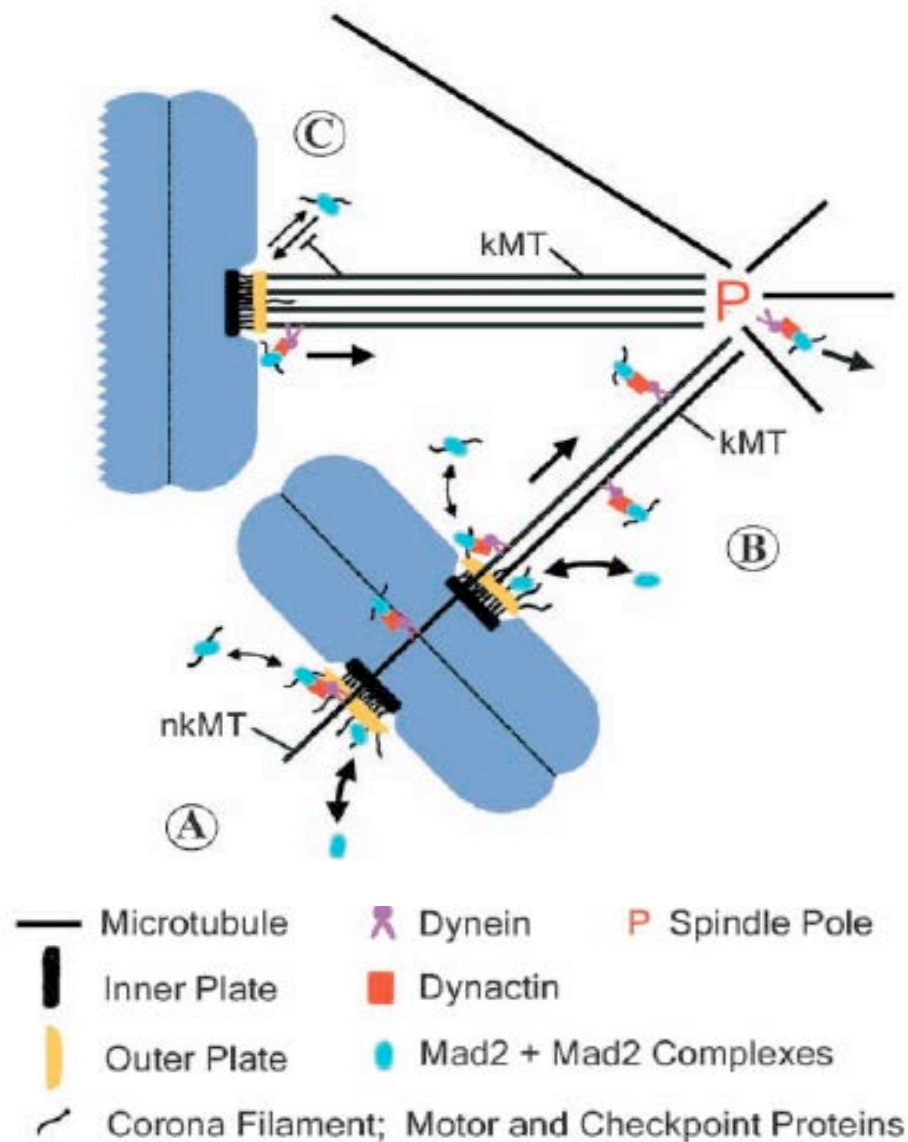


Figure 16 : modèle de transport vers les pôles du fuseau des protéines kinétochoriennes le long des microtubules par le complexe dynéine/dynactine (Howell et al., 2001). (A) Mad2 avec ses complexes plus d'autres protéines motrices forment un pool cytoplasmique sur le kinétochore libre où les protéines du SAC catalysent la formation du complexe inhibiteur Mad2-Cdc20. (B) La dissociation de Mad2 et d'autres composants du domaine externe du kinétochore se produit soit par échange direct avec le pool cytoplasmique ou par l'interaction entre le complexe dynéine/dynactine avec les microtubules kinétochoriens (kMT) ou non kinétochoriens (nkMT). Le complexe dynéine/dynactine transporte les protéines du SAC aux pôles où ils se dissocient dans le cytoplasme. (C) L'attachement correct du kinétochore par les microtubules sur les chromosomes en métaphase empêche l'association des composants de domaine externe, bloquant ainsi la formation du complexe inhibiteur Mad2-Cdc20 et permettant l'inactivation du SAC.

Le complexe du point de contrôle de la mitose MCC (mitotic checkpoint complexe) a été mis en évidence en purifiant un facteur inhibiteur de l'APC/C dans des cellules HeLa. Le MCC comprend deux sous complexes que sont Bub3-BubR1-Cdc20 et Mad2-Cdc20. In vitro, il inhibe l'APC/C 3000 fois plus que la protéine recombinante de Mad2 (Sudakin et al., 2001). C'est la forme non phosphorylée de Mad2 endogène qui interagit préférentiellement avec Mad1, Cdc20, Cdc27 et forme un complexe ternaire avec l'APC/C-Cdc20 (Wassmann et al., 2003). Toutefois, la voie de signalisation de Mad2 passe un changement de conformation de Mad2. En effet, Mad2 est une protéine du SAC, très conservée au cours de l'évolution, qui existe sous deux conformations : ouverte (O-Mad2) et fermée (C-Mad2). La conversion de O-Mad2 en C-Mad2 serait un événement crucial dans la signalisation du point de contrôle mitotique (Tipton et al., 2011a). O-Mad2, prédominante en interphase, existerait sous la forme d'un monomère ou d'un hétérodimère (O-C) tandis que la forme C-Mad2 existerait sous la forme d'un homodimère (C-C). Cette dernière forme est celle adoptée par Mad2 après sa liaison à Mad1, Cdc20 ou BubR1 (Chen et al., 1996 ; Luo and Yu, 2008 ; Tipton et al., 2011a ; Tipton et al., 2011b). L'augmentation du niveau intracellulaire de C-Mad2 durant la mitose par la conversion de O-Mad2 en C-Mad2 est catalysée par les kinétochores libres. Le niveau intracellulaire de C-Mad2 serait un facteur limitant majeur pour l'assemblage du MCC. En fait, la forme recombinante du MCC contenant C-Mad2 a une activité inhibitrice plus efficace de l'APC/C dans des cellules de HeLa que la forme recombinante du complexe ternaire BubR1-Bub3-Cdc20 (Tipton et al., 2011a). Ainsi, Mad1 recrute Mad2 au niveau d'un kinétochore libre. Il se forme ainsi un complexe Mad1-Mad2 qui convertit la forme libre et inactive de Mad2 dans le cytoplasme en Mad2 active. Ensuite, ce Mad2 ainsi activé interagit avec la Cdc20 pour activer d'autres molécules de Mad2 libres dans le

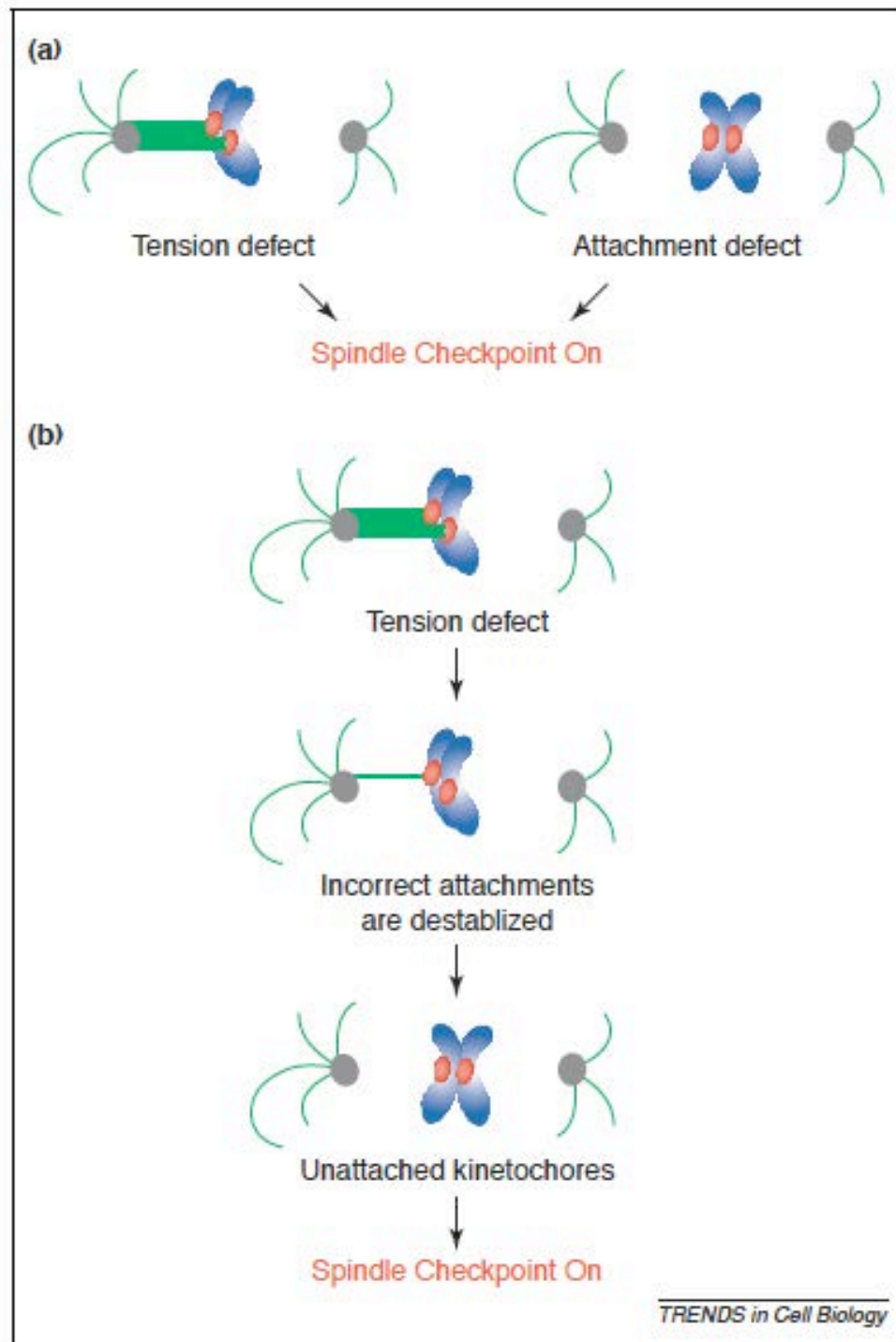


Figure 17: deux voies d'activation du SAC (Pinsky and Biggins, 2005).

(a) Les défauts de tension et d'attachement sont des signaux distinctement détectés par la cellule et conduisent à l'activation du SAC. (b) Les défauts de tension détectés par la cellule entraînent la déstabilisation de ces attachements inappropriés des microtubules. La déstabilisation de ces attachements crée des kinétochores libres qui activent le SAC.

cytoplasme (Luo et al., 2002 ; Sironi et al., 2002) (**Figure 18**). Mad2 est inactivée par p31comet qui rompt la liaison entre Mad2 et Mad1 ou Mad2 et Cdc20 (Yang et al., 2007).

A côté de ce complexe, il existe d'autres complexes du SAC qui participent soit au recrutement, soit à l'activation ou à la potentialisation de l'activité des protéines du SAC (**Tableau 2**).

2.2.3.2. Point de contrôle de la mitose ignoré (SAC override)

Le rôle majeur du point de contrôle de la mitose est d'empêcher les défauts de ségrégation des chromosomes qui conduisent à l'instabilité génétique. L'instabilité génétique aboutit à l'aneuploïdie qui est une des principales causes de la tumorigénération des cellules. Plusieurs facteurs peuvent conduire à l'affaiblissement du point de contrôle de la mitose. De ce fait, bien qu'il soit actif, il n'est pas assez robuste pour empêcher des cellules ayant des défauts de progresser durant la mitose. Le point de contrôle de la mitose devient « override » suite à l'inactivation ou à la surexpression des protéines impliquées dans son maintien en activité et ce, en présence de poisons des microtubules (nocodazole, taxol) qui induisent son activation et le maintiennent en activité pendant longtemps. Par exemple, le nocodazole dépolymérise les microtubules et empêche ainsi les attachements kinétochores-microtubules. Le taxol stabilise les microtubules et induit une baisse de la tension. Ces deux voies ont comme conséquence l'activation du SAC en réponse aux manques d'attachement (voie Mad2) et à la diminution de la tension (voie BubR1).

Plusieurs études ont permis de montrer que les kinases Aurora sont impliquées dans le fonctionnement du SAC. L'inhibition de la kinase Aurora-B induit

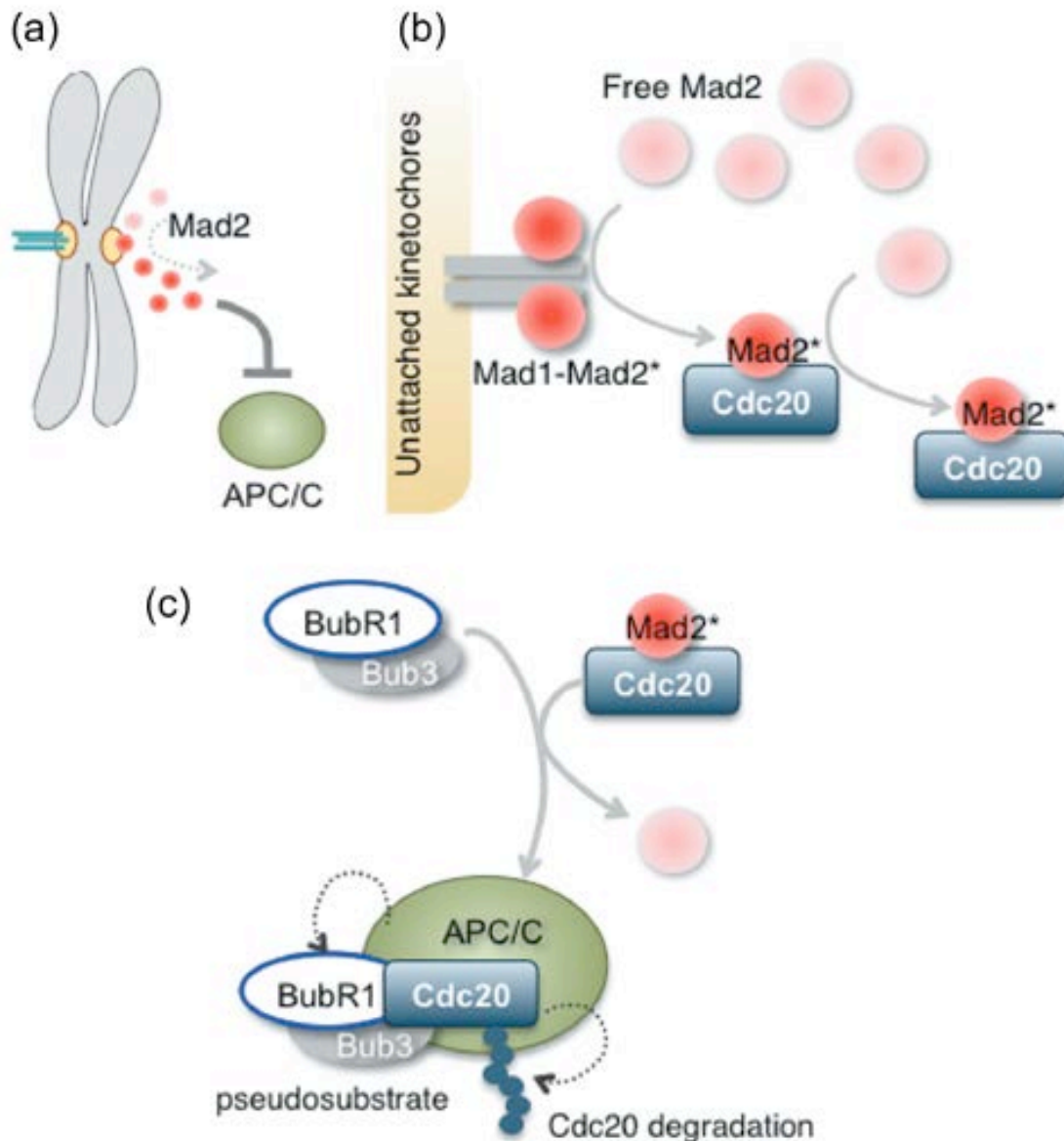


Figure 18: bases moléculaires du SAC (Tanaka and Hirota, 2009).

(a) Le signal SAC "attente de l'anaphase" est généré par un kinétochore libre. En interagissant avec ce kinétochore, Mad2 devient active (la couleur passe du rouge clair au rouge foncé). Ceci aboutit à l'inhibition de l'APC/C. (b) Deux conformations différentes de Mad2 sont représentées dans des cercles rouges foncés et clairs. Mad2 libre au cytoplasme (rouge clair) est convertie en une conformation qui peut se lier à Cdc20 (rouge foncé). Le complexe Mad1-Mad2 formé au kinétochore libre ainsi que le complexe Cdc20-Mad2 peuvent aussi catalyser ce changement de conformation. (c) Cdc20 passe de Mad2 au complexe BubR1-Bub3. BubR1 inhibe l'activité de l'APC/C en agissant comme un pseudosubstrat, et/ou par la médiation de l'ubiquitination et la dégradation de Cdc20 (indiqué par les flèches pointillées)

un défaut du SAC (Kallio et al., 2002 ; Ditchild et al., 2003 ; Hauf et al., 2003 ; Becker et al., 2010 ; Salmela et al., 2012). De même, l'amplification ou la surexpression de la kinase Aurora-A (Anand et al., 2003 ; Jiang et al., 2003) conduisent à outrepasser le SAC même en présence de poisons des microtubules. La kinase Aurora-A se localise au noyau en fin de prophase avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD). Là, elle phosphoryle CENP-A sur sa sérine 7. Cette phosphorylation permet d'élever considérablement le niveau de la kinase Aurora-B au centromère (Hirota et al., 2003 ; Kunitoku et al., 2003) qui porte les kinétochores. La kinase Aurora-B est impliquée dans le recrutement au kinétochores des MCC (Mitotic Checkpoint Components) (Ditchfield et al., 2003). Parmi ces protéines du SAC, Mad2 et BubR1 sont les plus importantes pour le SAC (Skoufias et al., 2001 ; Sudakin et al., 2001). Cependant, le lien entre la kinase Aurora-A et ces deux protéines du checkpoint semble jusque là méconnu.

2.2.3.3. Glissement mitotique

Théoriquement, le point de contrôle du fuseau mitotique (SAC) actif dès la fin de la prophase après la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD), bloquent les cellules en prométaphase le temps qu'il faut pour corriger les défauts d'attachement kinétochores-microtubules, et/ou de congression et d'alignement chromosomiques en métaphase. Dès lors qu'il est satisfait, les cellules entament l'anaphase. Mais, dans la pratique et comme pour la plupart des points de contrôle du cycle cellulaire, la sortie de mitose des cellules ne nécessite pas obligatoirement la satisfaction du point de contrôle du fuseau mitotique (SAC). En fait, les cellules peuvent bien s'échapper de la mitose pour entrer en G1 malgré un SAC non satisfait. Ce processus a été décrit comme étant le « *Mitotic Slippage* » et nécessite

Molecular components of the spindle checkpoint.					
Veterbrates	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Kinetochore localisation	Domains and motifs	Interactions and functions
Mad1	Mad1	Mad1	Yes	Coiled-coil	Binds to Mad2 and recruits Mad2 to Kinetochores; phosphorylated by Mps1 and Bub1 <i>in vitro</i> .
Mad2	Mad2	Mad2	Yes	HORMA	Binds to Cdc20 and inhibits APC; binds to Mad1
BubR1	Mad3	Mad3	Yes	TPR [*] ; GLEBS; kinase [†]	Binds to Bub3 and Cdc20; inhibits APC <i>in vitro</i> ; binds to the mitotic motor CENP-E
Bub1	Bub1	Bub1	Yes	TPR [*] ; GLEBS; kinase	Binds to Bub3; binds to Mad1 and Cdc20 in <i>S. cerevisiae</i> ; phosphorylates human Mad1 <i>in vitro</i>
–	Bub2	cdc16	–	GAP	Negatively regulates Tem1 and the mitotic exit network in <i>S. cerevisiae</i>
Bub3	Bub3	Bub3	Yes	WD-40	Binds to Bub1 and BubR1(Mad3)
Mps1	Mps1	mph1	Yes	TPR [*] ; kinase	Phosphorylates Mad1 in <i>S. cerevisiae</i>
Aurora B	Ipl1	ark1	Yes	Kinase	Binds to INCENP/Slit15/Pic1; promotes bi-orientation
Rod	–	–	Yes	–	Binds to Zw10
Zw10	–	–	Yes	–	Binds to Rod and Zwint-1 (a coiled-coil protein)
–	Cdc55	–	–	ASBD	Regulatory B subunit of PP2A; regulates Swe1 degradation
Cdc20	Cdc20	Slp1	Yes	C-box; D-box; KEN-box; WD-40	Binds to Mad2, BubR1(Mad3), Emi1, APC, and APC substrates; activates APC; ubiquitinated by APC-Cdh1; phosphorylated by Cdk1 in mammals

^{*}The amino-terminal 150 residues of Bub1, BubR1, Mad3 and Mps1 from all organisms share low sequence homology and contain structural motifs similar to the tetratricopeptide repeats (TPRs) (H Yu, unpublished data). The kinase domain of BubR1 lacks key catalytic residues and may not be a functional kinase.

Tableau 2 : Composants du SAC (Yu, H., 2002).

Ce tableau présente les protéines du SAC chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* dans leur localisation kinétochorienne et leurs fonctions.

l'ubiquitinylation et la protéolyse de la cycline B (Hunt et al., 1992 ; Andreassen and Margolis, 1994 ; Brito and Rieder, 2006). Il constitue une alternative à l'apoptose tout comme il peut y conduire (Blagosklonny, 2007) en ce sens que des cellules qui s'échappent par glissement mitotique sont capables de proliférer (Figure 19).

Le glissement mitotique dépendrait du type et du génotype des cellules avec des mutations pouvant affecter les protéines du SAC. Par exemple, avec des cellules humaines, il interviendrait au bout de 20h environ en dépolymérisant les microtubules avec du nocodazole (Jordan et al., 1992) et/ou de la vinblastine (Brito et al., 2008) tandis qu'il n'arriverait qu'au bout de 4h environ avec des fibroblastes de souris (Lanni and Jacks, 1998) en présence de nocodazole. Cependant, le délai induit dans la survenue du glissement mitotique varie selon le type de poison ainsi que la concentration utilisée (Tableau 3) (Rieder and Maiato, 2004 ; Brito et al., 2008).

Par ailleurs, si le SAC n'est pas satisfait, le nombre et la dynamique des microtubules ne semblent avoir aucun effet accélérateur sur le glissement mitotique selon les travaux réalisés par Brito et al. (2008). Ceci est dû au fait que ces auteurs ont utilisés des inhibiteurs de Eg5. Les inhibiteurs de Eg5 maintiennent le SAC actif mais n'affectent pas le mécanisme d'ubiquitination ou de protéolyse de la cycline B (Kapoor et al., 200).

Enfin, la survie des cellules humaines sorties de mitose après blocage au nocodazole ou au taxol semble essentiellement due au génotype des cellules. Elle est significativement plus élevée chez les cellules non transformées RPE-1 par rapport aux cellules cancéreuses U2OS et HeLa (Brito and Rieder, 2009).

Ceci pourrait être dû à l'activation des gènes suppresseurs de tumeur (p53, p73). Il a été démontré que le taxol, la vinblastine et le nocodazole augmentent

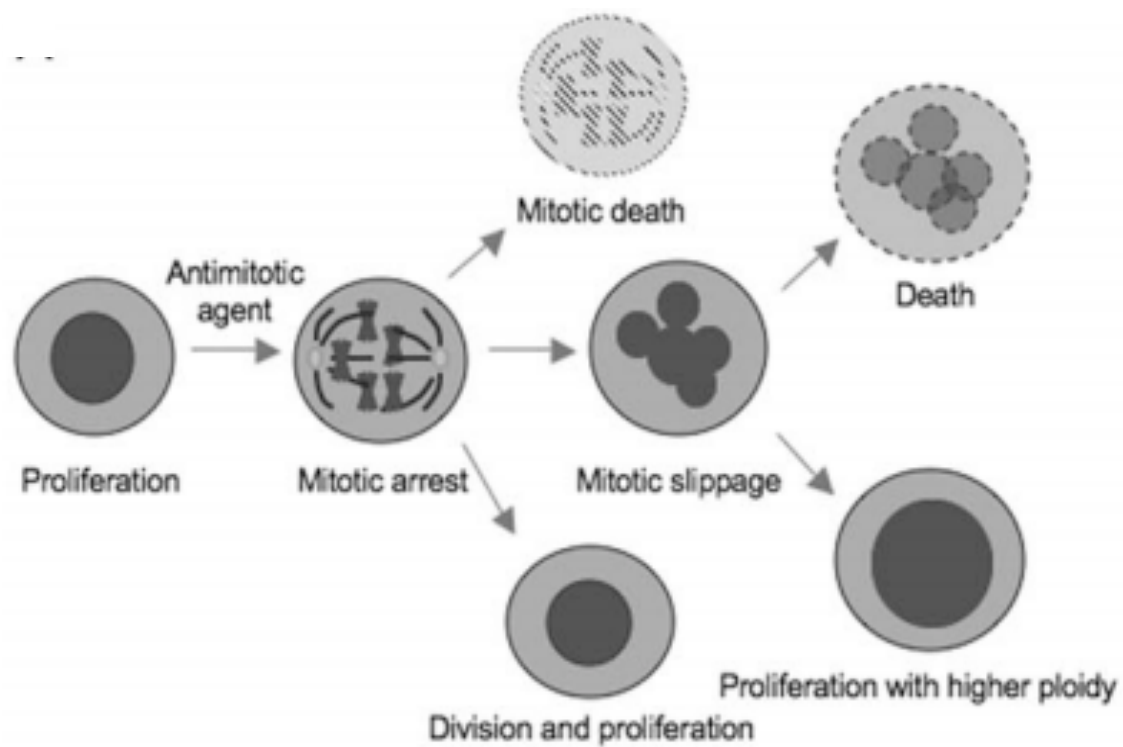


Figure 19: processus de survenue du glissement mitotique après induction d'un arrêt mitotique avec le taxol (Riffell et al., 2009).

Les cellules qui subissent le glissement mitotique continuent à se diviser avec une forte ploïdie si elles ne meurent pas par apoptose.

l'activité transcriptionnelle de p53 (Tisher et al., 1995). Toutefois, la phosphorylation et l'activation de p53 suite à une perturbation du fuseau mitotique requièrent BubR1 et Mps1 (Ha et al., 2007 ; Huang et al., 2009). Il est fort probable que les cellules RPE-1 satisfassent le SAC alors que les U2OS et les HeLa ne le satisfassent pas avant de sortir de la mitose. Chez ces cellules on observe par immunofluorescence la présence de Mad1, Mad2 et BubR1 aux kinétochores (Brito and Rieder, 2006). De même, il a été établi que p73 interagissait avec Bub1, Bub3 (Vernole et al., 2009) au niveau des kinétochores. Ceci renforcerait l'activité de BubR1 (Tomasini et al., 2009). Par conséquent, le renforcement de l'activité de p53 et p73 augmente la sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite en réponse aux dommages liés à l'ADN.

En outre, après induction chimique du glissement mitotique par du taxol ou de la vinblastine, les cellules subissent plusieurs cycles de réplication de leur ADN sans pour autant se diviser. Ensuite, elles montrent des signes de sénescence avant de toutes mourir. En revanche, les cellules traitées avec l'inhibiteur de la kinésine motrice Eg5/KSP (S-trityl-L-cystéine), se divisent avec succès et continuent à proliférer (Figure 14 ; Riffell et al., 2009).

2.2.4. Cytodiérèse (cytocinèse)

C'est l'aboutissement de la division cellulaire avec l'obtention de deux cellules filles rigoureusement identiques. Elle se caractérise par la formation de l'anneau contractile d'acto-myosine ou corps intermédiaire. En son milieu s'établit une compaction des microtubules du fuseau central (central spindle) pour former le midbody (Guertin *et al.*, 2002). C'est au niveau du midbody que se localisent les protéines indispensables au bon déroulement de la cytokinèse. Elles sont appelées protéines passagères des chromosomes « chromosomal passenger protein » (Adams et al., 2001). Elles comprennent les kinases Aurora-B et PLK1, la protéine

Component	Main structural features	Comments
Mad1	Coiled-coil	Recruits Mad2 at kinetochores Its levels are not cell-cycle regulated
Mad2	Horm domain ¹²²	Binds Mad1 and Cdc20 Its levels are not cell-cycle regulated
BubR1 (Mad3)	Serine/threonine kinase	Binds Bub3, capable of autophosphorylation Its levels are not cell-cycle regulated Yeast Mad3 lacks the kinase domain
Bub1	Serine/threonine kinase	Reported substrates include Bub3 (REF 107), Mad1 (REF 81) and adenomatous polyposis coli (REF 121) Its levels are cell-cycle regulated ³³
Bub3	Seven WD40 repeats*	Interacts with Bub3-binding domains in Bub1 and BubR1 Its levels are not cell-cycle regulated
Mps1	Dual-specificity kinase	Also known as T-cell tyrosine kinase (TTK) Role in the recruitment of checkpoint proteins at kinetochores Reported substrates include Mad1, Spc110 (also required for spindle-pole-body duplication in budding yeast)
CENP-E	Kinesin-like plus-end-directed motor	Substrate of mitogen-activated protein kinase ¹²³ Interacts with microtubules and BubR1 Yeast kinesin homologues unclear
Ipl1	Aurora kinase	Clear role in ensuring bipolar orientation ⁴⁴ Proposed to sense tension at kinetochores ⁴⁶
Zw10	None described	Probably complexed to Rod Important for localizing dynein at kinetochore No clear yeast homologue
Rod	None described	Possibly complexes to Zw10 Important for localizing dynein to kinetochore No clear yeast homologue
Mitogen-activated protein kinase	Kinase	Important in many signal-transduction pathways, but role in checkpoint unclear Activates p90 ^{Rsk} , which in turn activates Bub1 during <i>Xenopus</i> oocyte maturation ¹²⁴

Complex	Comments
Mad1–Mad2	Possibly located at nuclear pore complex in interphase ⁸² . Very stable except at kinetochores, where it might be turned into a high-turnover complex
Mad2–Cdc20	Forms <i>in vitro</i> using purified components but will not form in cells unless Mad1 is present Inhibits the ability of Cdc20 to activate APC
Bub3–Bub1, Bub3–BubR1/Mad3	Bub3 might form constitutive interactions with Bub1 and BubR1/Mad3. Bub3 purifies with BubR1, suggesting that the complex is stable
Mad2–Cdc20–BubR1/Mad3–Bub3	Has been observed in budding yeast and HeLa cells. Might be crucial for checkpoint inhibition of APC
BubR1–CENP-E	Stoichiometric complex. Possible link between attachment machinery to the spindle checkpoint
BubR1–Cdc20	Forms <i>in vitro</i> using purified components. Inhibits the ability of Cdc20 to activate APC
Zw10–Rod	Direct interaction has not been shown, but the two proteins purify in a complex ¹²⁵

*The crystal structure of budding yeast Bub3 has recently been solved (David Wilson, University of California, Davis, personal communication) and shown to consist of the classic arrangement of seven blades, forming a propeller structure. APC, anaphase-promoting complex.

Tableau 3 : Composants et complexes du SAC (Musacchio and Hardwick, 2002).
Différentes fonctions des composants et complexes du SAC.

INCENP (inner centromer protein, Cooke et al., 1987), la survivine (Ambrosini et al., 1997) et les kinésines motrices associées aux microtubules. La kinase Plk1 interviendrait dans la dégradation de la Cycline B mais aussi l'inactivation de Cdk1. Cette inactivation de CDK1 est incontournable dans le déclenchement de la cytokinèse (revue par Meijer L., 2003). Quant à la kinase Aurora-B, elle formerait un complexe avec les protéines INCENP et Survivine (Bolton et al., 2002). Par exemple, chez *C. elegans*, Aurora-B serait nécessaire au recrutement de la protéine Zen-4 (ou MKLP-1 : mammalian kinesin-like protein-1). La kinésine MKLP1 est surtout requise pour la complétion de la cytokinèse (Severson *et al.*, 2000). En outre, la chaîne légère régulatrice de la Myosine II est phosphorylée par la kinase Aurora-B. Cette phosphorylation a lieu sur le résidu de sa sérine 19 (Murata-Hori et al., 2000). Enfin, la phosphorylation de cette sous-unité de la myosine par la kinase Aurora-B serait nécessaire pour la cytokinèse (Iwasaki *et al.*, 2001) en ce sens que sa forme non phosphorylable induite par mutation entraînerait un défaut de cytokinèse.

	Espèces à 1 kinase		Espèces à 2 kinases			Espèces à 3 kinases		
Kinases	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Aurora-A	-	-	Eg2	AIR-1	Aurora	Aurora2 AUR2 AIK AIRK1 BTAK STK6 STK15	ARK1 AYK1 IAK1	-
Aurora-B	lpl1	ARK1	AIRK2	AIR-2	IAL	Aurora1 AUR1 AIK2 AIRK2 STK12	ARK2 STK-1	AIM-1
Aurora-C	-	-	-	-	-	Aurora3 AIE2 AIK3 AIRK3 STK13	AIE1 IAK3	-

Tableau 4 : Nomenclature et classification des kinases membres de la famille des sérines/thréonines « Aurora » chez différentes espèces animales.

Chapitre 2 : Les kinases mitotiques « Aurora »

2.1. Historique :

Les protéines mitotiques de la famille « Aurora » sont des protéines kinases qui phosphorylent des résidus sérines/thréonines. Ce sont des protéines régulatrices clés de la mitose. Leur phylogénèse montre qu'elles sont très conservées au cours de l'évolution, et seraient apparentées aux protéines kinases A, G et C (Gold et al., 2006). Le domaine catalytique des kinases « Aurora » montre un taux d'homologie allant de 67 à 76%. Cependant, elles possèdent un domaine régulateur N-terminal très divergent (Giet et al., 1999 ; Nigg, 2001). Elles montrent également des différences quant à leur profil d'expression, leur localisation subcellulaire ainsi que leur activité enzymatique (Ke et al., 2003 ; Méraldi et al., 2004).

La taxonomie des kinases « Aurora » est très variable suivant les organismes. Néanmoins, le mot Aurora utilisé pour la première chez la Drosophile est maintenant employé comme terme générique et proviendrait de l'expression « *Aurores boréales* » en vertu de la localisation polaire de la kinase (Glover et al., 1995). De même, le nombre des kinases « Aurora » varie de 1 à 3 suivant les espèces animales, de la levure à l'homme respectivement (**Tableau 4**).

2.1.1. Les organismes à une kinase Aurora

Originellement, le premier membre de la famille des sérines/thréonines kinases « Aurora » a été découvert par Chan and Botstein (1993) suite à un crible génétique sur des mutants *Saccharomyces cerevisiae* montrant des défauts de

ségrégation de leurs chromosomes. Il a été dénommé Ipl1 (increase-in-ploidy 1) dont le gène est porté par le chromosome XVI.

Par ailleurs, la protéine kinase Ipl1p chez *S. cerevisiae* (Chan and Botstein, 1993 ; Francisco et al., 1994 ; Tung et al., 1995) et son homologue Ark1p (aurora related kinase 1, Petersen et al., 2001) chez *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) sont les seuls membres de la famille des kinases « Aurora » jusque-là observés chez les levures (Méraldi et al., 2004). Toutefois, leurs phénotypes rappellent rigoureusement ceux de la kinase Aurora-B des mammifères (Marumoto et al., 2005 ; Vader and Lens, 2008). Les mutations des gènes Ipl1 (*S. cerevisiae*) ou Ark1 (*S. pombe*) induisent une mauvaise ségrégation des chromosomes durant la mitose.

2.1.2. Les organismes à deux kinases Aurora

La première kinase « Aurora » d'un organisme multicellulaire a été découverte par l'équipe de Glover (Glover et al., 1995) suite à un crible génétique sur des mutants drosophiles (*Drosophila melanogaster*) incapables de séparer leurs centrosomes et d'établir un fuseau bipolaire. Cette protéine kinase correspond phénotypiquement à la kinase Aurora-A des mammifères. Ensuite, Reich et al. (1999) puis Mesilaty-Gross et al. (1999) ont identifié le second gène Aurora « IAL1 » chez *D. melanogaster*. La protéine kinase IAL1 est l'homologue de la protéine kinase Aurora-B des mammifères (Méraldi et al., 2004).

De même que la drosophile, le ver *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) possède deux gènes (AIR-1 et AIR-2) codant pour les protéines kinases Aurora-A et -B respectivement. La kinase AIR-1 (Schumacher et al., 1998a) est impliquée dans la mise en place du fuseau mitotique tandis que la kinase AIR-2 est requise pour la

ségrégation des chromosomes et la cytokinèse (Schumacher et al., 1998b ; Severson et al., 2000). Toutefois, il faut signaler que le rôle de AIR-2 durant la cytokinèse semble être médié par la kinésine ZEN-4/MKLP1 (Severson et al., 2000).

Par ailleurs, un vertébré non mammalien, le xénope (*Xenopus laevis*), possède également les deux kinases Aurora-A (Eg2) et -B (AIRK2). La protéine kinase pEg2 est requise pour la mise en place du fuseau bipolaire dans des extraits d'œufs de xénope (Roghi et al., 1998). La protéine kinase AIRK2 (Adams et al., 2000) se lie à INCENP et les deux protéines colocalisent au centromère et au fuseau central (central spindle). Sa surexpression induit un défaut de cytokinèse et la multinucléation cellulaire.

2.1.3. Les organismes à trois kinases Aurora

Contrairement aux invertébrés pluricellulaires (*Drosophile*, ver) et aux amphibiens (Xénope), les mammifères possèdent trois gènes codant pour les protéines kinases « Aurora » : Aurora-A, Aurora-B et Aurora-C (Nigg, E.A., 2001 ; Meraldi et al., 2004).

Aurora-A (initialement nommée Aurora-2) :

Le gène Aurora-A (AYK1) a été cloné et caractérisé dans des cellules embryonnaires et germinales de souris par Yanai et al. (1997). Les résultats de leurs analyses biochimiques ont montré que ce gène était particulièrement exprimé dans des cellules actives en méiose avec une accumulation des transcrits juste avant la première division méiotique.

Au cours de la progression du cycle cellulaire, les premiers transcrits apparaissent peu nombreux à la transition G1/S puis augmentent considérablement

en G2/M avant de disparaître en fin de mitose (Gopalan et al., 1997). D'après Shindo et al. (1998), la kinase Aurora-A (ARK1) joue un rôle différent de celui de sa congénère Aurora-B (ARK2) au cours du cycle cellulaire. L'analyse de la localisation de la protéine Aurora-A (IAK1) par immunocytochimie faite par l'équipe de Gopalan et ses collaborateurs dans des fibroblastes de souris (NIH 3T3) montrent que Aurora-A se localise sur les centrosomes (interphase et mitose) et le fuseau mitotique préférentiellement. Cependant, dans les phases tardives de la mitose (télophase et cytokinèse), elle se localise aussi au midbody.

C'est dans la même étude que Bischoff et al. (1998) ont isolé et caractérisé les gènes complets Aurora-A et Aurora-B chez l'espèce humaine. Toutefois, Sen et al. (1997) avaient identifié et décrit un cDNA partiel codant pour une kinase baptisée BTAK (breast-tumor-amplified kinase) qui était Aurora-A (Kimura et al., 1997a ; Kimura et al., 1997b), et dont le gène humain correspondant est STK15 (Zhou et al., 1998) (Stk6 chez la souris). L'analyse par Northern blot du profil de distribution tissulaire des ARN messagers de Aurora-A chez l'homme montre une forte expression dans le testicule mais apparaissait aussi dans le thymus, la rate, le muscle squelettique, la moelle osseuse, le nœud lymphatique, la rate et le foie fœtal. Aussi, les résultats de leurs analyses par Western blot montrent que la protéine kinase est présente dans plusieurs cellules prolifératives humaines (Kimura et al., 1997a, Bischoff et al., 1998). Ceci pourrait présumer d'un caractère oncogène de la kinase Aurora-A.

Comme pour IAK1 chez *Mus musculus* (Gopalan et al., 1997), l'étude de la localisation subcellulaire par Immunofluorescence indirecte démontre que la protéine kinase Aurora-A est étroitement liée aux centrosomes et au fuseau mitotique (Kimura et al., 1997a, Bischoff et al., 1998 ; Zhou et al., 1998). Enfin, la kinase Aurora-A

serait activée avant la kinase Aurora-B au cours du cycle cellulaire. En effet, l'activité de la kinase Aurora-A atteint son maximum à la transition G2/M juste avant l'activation maximale de la kinase p34^{cdc2} (Kimura et al., 1997a, Bischoff et al., 1998 ; Zhou et al., 1998) alors que l'activité kinase de Aurora-B n'atteint son maximum qu'après l'inactivation de la kinase p34^{cdc2}. De plus, cette activité kinase est requise pour réguler le cycle cellulaire (Bischoff et al., 1998).

Aurora-B (initialement nommée Aurora-1) :

Chez les rongeurs, le gène codant pour la sérine/thréonine kinase Aurora-B a été isolé par Niwa et ses collègues (Niwa et al., 1996) dans des cellules souches embryonnaires et dans les testicules de souris (*Mus musculus*). Ensuite, Shindo et al. (1998) ont montré que la kinase Aurora-B localise au midbody (corps intermédiaire). Parallèlement, la protéine kinase Aurora-B, a été identifiée dans des tissus de rat (*Rattus norvegicus*) par Terada et al., (1998). Par immunofluorescence, cette équipe a montré que la protéine kinase se localisait préférentiellement au fuseau central et au midbody. De plus, les résultats des travaux de cette équipe ont permis de montrer que Aurora-B était non seulement requise pour la ségrégation des chromosomes mais aussi pour la cytokinèse puisque l'expression du dominant négatif de Aurora-B induit un défaut de cytokinèse et la multinucléation des cellules.

Chez *Homo sapiens*, la kinase Aurora-1 a été identifiée pour la première fois par Bischoff et al. (1998). Le cDNA codant pour cette kinase a également été identifié par une approche in silico par l'équipe de Claude Prigent (Prigent et al. 1999). Suite à un crible génétique destiné à identifier des protéines surexprimées dans les cancers colorectaux, Bischoff et ses collègues (Bischoff et al., 1998) ont caractérisé le profil d'expression et la localisation de la kinase Aurora-B. Cette kinase

est moins abondante en S phase, elle s'accumule durant la mitose avant de disparaître en sortie de mitose. Le gène STK12 code pour Aurora-B est localisé en 17q13 (Kimura et al., 1998) (Prigent et al., 1999). Par Northern blot, Bischoff et al. (1998) ont montré que les ARN messagers de Aurora-B humaine étaient fortement exprimés dans le thymus adulte et le foie fœtal mais moyennement exprimés dans les poumons et l'intestin grêle. Elle se localise dans les cellules humaines de la même façon que son homologue chez le rat (Terada et al., 1998).

Plusieurs études ont montré que l'activité de la kinase Aurora-B est nécessaire pour corriger les erreurs d'attachement kinétochores-microtubules en prométaphase. Elle est requise pour la bonne ségrégation des chromosomes en anaphase. Enfin, sa surexpression et/ou sa suppression empêche la cytokinèse (Lampson and Cheeseman, 2011).

Aurora-C (initialement nommée Aurora-3) :

Cette protéine kinase a été identifiée pour la première chez la souris (AIE1) et chez l'homme (AIE2) par Tseng et al. (1998). Cependant, c'est Bernard et al. (1998) qui ont identifié le gène codant pour la protéine kinase humaine. Dans cette même étude, ils ont établi la localisation chromosomique du gène STK13 par Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) en position 19q13.

Cette protéine kinase a un caractère tissu-spécificité très marqué. En effet, le profil d'expression des ARN messagers de cette kinase par Northern blot montre une très forte expression dans le tissu testiculaire alors qu'elle est pratiquement indétectable dans les cellules somatiques (Tseng et al., 1998 ; Kimura et al., 1999). Mais, une étude plus récente a réussi à montrer par RT-PCR que les ARN messagers de la kinases Aurora-C sont non seulement très fortement exprimés dans

les testicules mais également dans seize autres tissus humains à un faible niveau (Yan et al., 2005). Selon Kimura et al., 1999, le profil d'expression de la protéine kinase Aurora-C est identique à celle de Aurora-B (Gopalan et al., 1997 ; Bischoff et al., 1998) et Aurora-A (Bischoff et al., 1998). Son niveau d'expression est bas à la transition G1/S. Ensuite, la kinase s'accumule et atteint son pic en G2/M. Enfin, elle disparaît à la fin de la mitose. Son association avec les centrosomes en fin de phase G2 suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans le fonctionnement des centrosomes dans les phases tardives de l'interphase (Dutertre et al., 2005). Toutefois, il est à noter que la kinase Aurora-C est la moins étudiée des trois kinases de la famille des kinases Aurora.

2.2. Structures et évolution

Les gènes qui codent pour les protéines kinases Aurora-A, -B et -C humaines sont localisés sur les chromosomes 20q13.2 pour STK15/Aurora-A (Sen et al. 1997 ; Kimura et al., 1997b ; Zhou et al., 1998 ; Bischoff et al., 1998), 17p13.1 pour STK12/Aurora-B (Kimura et al., 1998) et 19q13.3 STK13/Aurora-C (Tseng et al., 1998 ; Bernard et al., 1998 ; Kimura et al., 1999), respectivement. Les séquences nucléotidiques des kinases « Aurora » comportent entre 309 à 403 acides aminés. Le cDNA qui code pour la kinase Aurora-A comporte 403 acides aminés ayant un poids moléculaire de 45,8 kDa. Le cDNA qui code pour la kinase Aurora-B comprend 344 acides aminés avec un poids moléculaire de 39,3 kDa (Bischoff et al., 1998). Le cDNA qui code pour la kinase Aurora-C est constitué de 309 acides aminés ayant un poids moléculaire de 35.9 kDa (Kimura et al., 1999).

Les kinases « Aurora » présentent une organisation structurale à trois domaines. Le domaine kinase qui porte la boucle d'activation est entouré par le

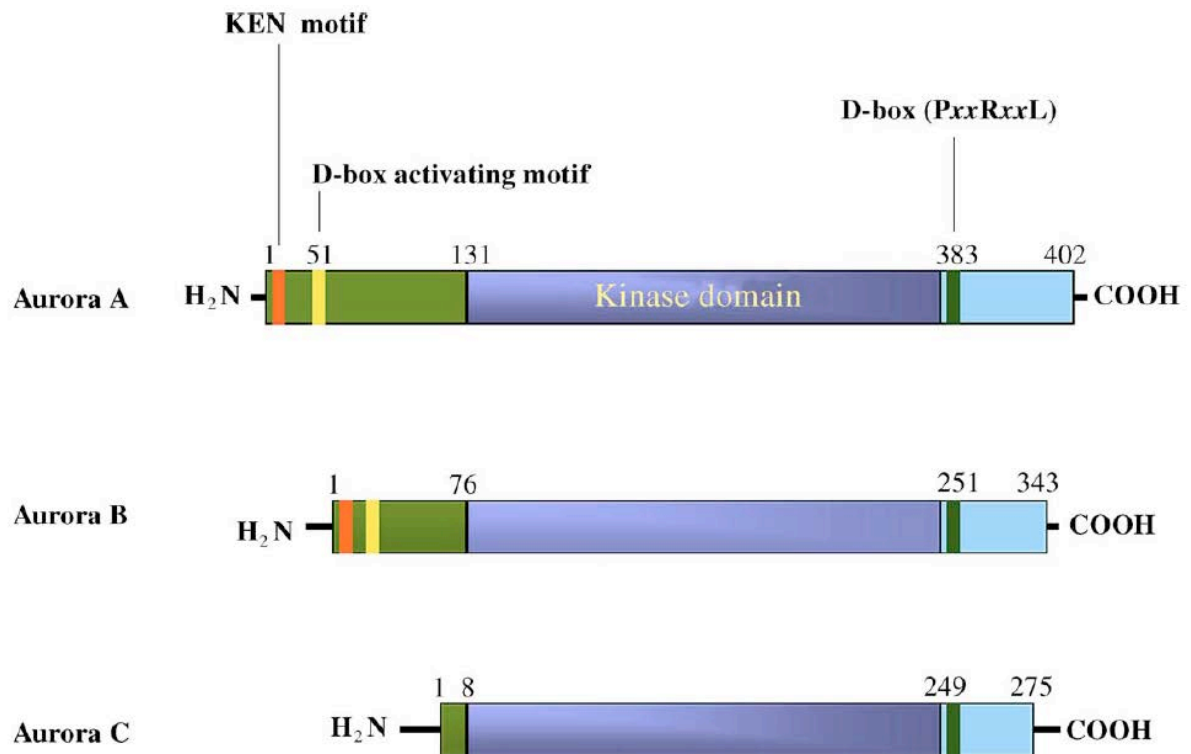


Figure 20: structure des kinases Aurora-A, -B et -C avec leurs domaines régulateur, kinase (catalytique) et carboxyl en vert, violet et bleu respectivement. On observe également les différents motifs régulateurs de ces kinases : KEN, DAD portés par le domaine régulateur et D-box située sur le domaine carboxy-terminal (Bolanos-Garcia, 2004).

domaine régulateur (N-terminal) comprenant 39 à 129 acides aminés et celui carboxyle (C-terminal) comportant 15 à 20 acides aminés (Bischoff and Plowman, 1999 ; Bolanos-Garcia, 2005) (Figure 20). Aussi, les séquences des kinases Aurora-A, -B et -C possèdent un ‘motif signature kinase’ très conservé entre elles. Ce motif signature des kinases « Aurora » est une séquence consensus de type “DFGWSxxxxxxxxRxTxCGTxDYLPPE”. Cette séquence peptidique est située entre les sous-domaines VII et VIII de la boucle d’activation (Giet and Prigent, 1999). Elle constitue le site de liaison à l’ATP et est entourée par 26 résidus dont trois variants seulement (Leu215, Thr217, R220) sont spécifiques à la kinase Aurora-A (Brown et al., 2004). A titre d’exemple, la thréonine 217 de la kinase Aurora-A correspond à l’acide glutamique chez les kinases Aurora-B et -C (Cheetham et al., 2002) (Figure 21). D’après Giet and Prigent (1999), l’activation de ces kinases se fait par la phosphorylation du résidu thréonine de type RXT de cette séquence consensus. Et, ce motif RXT est similaire au site de phosphorylation du domaine d’activation de la protéine kinase A (PKA). De plus, il a été montré qu’en mutant le résidu thréonine de ce motif RXT en acide aspartique chez la kinase Aurora-A, on mime une phosphorylation constitutive générant ainsi une kinase constitutivement active (Bischoff et al., 1998).

Par ailleurs, seules les séquences des kinases Aurora-A et -B comportent un motif “KEN” couvrant 11 à 18 résidus dans leur domaine N-terminal. En outre, elles comportent, dans ce même domaine régulateur, un motif “QRLV” (A-box) d’activation de la D-Box (destruction box ou *boîte de dégradation*) de type RxLxPS couvrant 33 à 43 résidus. Ces motifs très conservés serviraient de sites de reconnaissance du signal des complexes APC/Cdc20 ou APC/Cdh1. Leurs mutations (KEN en AAN ou QRLV en AAAA) permet de stabiliser les kinases

(Bischoff and Plowman, 1999 ; Pfleger and Kirschner, 2000 ; Castro et al., 2002a ; Littlepage and Ruderman, 2002 ; Bolanos-Garcia, 2005 ; Nguyen et al., 2005). Par contre, Katayama et al. (2003) indiquent que trois boîtes putatives ont été identifiées dans le domaine régulateur des kinases « Aurora » (A-boxI, A-boxII, A-boxIII) (Figure 22). Ces trois A-box seraient plutôt impliquées dans la localisation subcellulaire et la reconnaissance des substrats de ces kinases. En revanche, les trois kinases possèdent le motif D-Box de type RxxLxxG situé au niveau de leur domaine C-terminal entre les sous-domaines X et XI (Giet and Prigent, 1999 ; Bolanos-Garcia, 2005). Ce motif D-box est caractérisé par la présence de deux résidus (arginine et leucine) qui restent invariablement conservés chez les kinases « Aurora » (Giet and Prigent, 1999). Toutefois, il est à noter que la séquence du domaine catalytique de la kinase Aurora-A contiendrait trois motifs D-box (Honda et al., 2000 ; Castro et al., 2002b ; Nguyen et al., 2005).

Par cristallographie, quelques études ont permis d'analyser la structure moléculaire de la protéine kinase « Aurora-A » (Cheetham et al., 2002 ; Nowakowski et al., 2002 ; Bayliss et al., 2003 ; Dodson et al., 2010) et « Aurora-B » (Sessa et al., 2005 ; Andersen et al., 2008 ; Girdler et al., 2008 ; Elkins et al., 2012). Globalement, la structure des kinases Aurora-A et -B humaines et Aurora-B du xénope sont similaires à l'exception de la boucle d'activation. En effet, l'analyse de la structure de la kinase Aurora-B humaine montre qu'il y a, entre leurs domaines kinases, 80% et 72% de similitude avec Aurora-B du xénope et Aurora-A humaine respectivement (Elkins et al., 2012). Enfin, la troncation du domaine N-terminal de la kinase Aurora-A (Aurora A-Δ120) permet de la localiser aux kinétochores et non aux centrosomes (Hans et al., 2009).

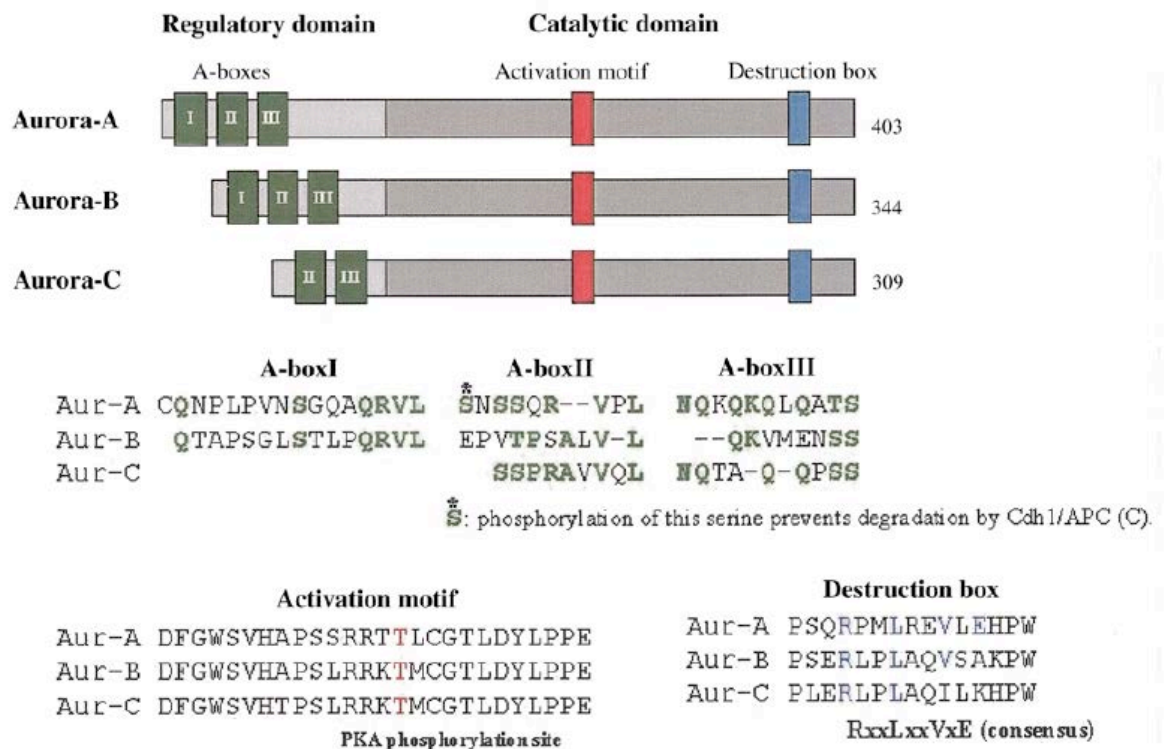


Figure 22: structure des kinases Aurora-A, -B et -C avec l'alignement de leurs domaines régulateur et catalytique. Les trois boîtes putatives (A-box I, II et III) et leurs séquences motifs sont indiquées en vert. Les motifs d'activation et boîtes de destruction dans le domaine catalytique sont indiqués en rouges et bleus respectivement. Les résidus d'acides aminés conservés dans chaque motif sont affichés en couleurs de caractère. D'après Katayama et al. (2003).

Chez les humains, les séquences nucléotidiques du domaine C-terminal sont identiques à 71% entre Aurora-A et -B (Carmena and Earshaw, 2003), et 73% entre Aurora-B et -C (Bischoff and Plowman, 1999 ; Bolanos-Garcia, 2005). D'une manière générale, l'homologie entre les séquences nucléotidiques des kinases « Aurora » humaines et celles des rongeurs est de 82%, 84% et 78% respectivement pour Aurora-A, -B et -C (Bischoff and Plowman, 1999). Par conséquent, les kinases « Aurora » semblent avoir évoluées à partir d'un ancêtre commun ; les urochordés (Figure 23). La kinase Aurora-A présente un lien orthologue entre les vertébrés à sang froid et les mammifères. Les kinases Aurora-B et -C dérivent de la duplication plus récente d'un gène commun présent chez les vertébrés à sang froid (Brown et al., 2004).

L'analyse par cristallographie de la structure du domaine catalytique de la kinase Aurora-A laisse apparaître d'énormes similitudes avec les tyrosines kinases (SRC) et les protéines kinases AGC. Toutefois, les résidus de la boucle d'activation de la kinase sont structurellement et biologiquement spécifiques aux kinases « Aurora » (Cheetham et al., 2002). De fait, cette spécificité revêt un caractère important dans l'élaboration d'inhibiteurs spécifiques à cette famille des kinases. En revanche, elle pose un problème majeur quant à l'obtention d'inhibiteurs spécifiques à chacune des trois kinases « Aurora ».

2.3. Régulation de l'activité des kinases « Aurora »

L'activité des kinases de la famille « Aurora » est régulée par phosphorylation au cours du cycle cellulaire. La kinase humaine Aurora-A doit, par exemple, être phosphorylée sur la Threonine 288 de la boucle d'activation pour être active. Cette phosphorylation est gouvernée par des protéines qui interagissent avec Aurora-A.

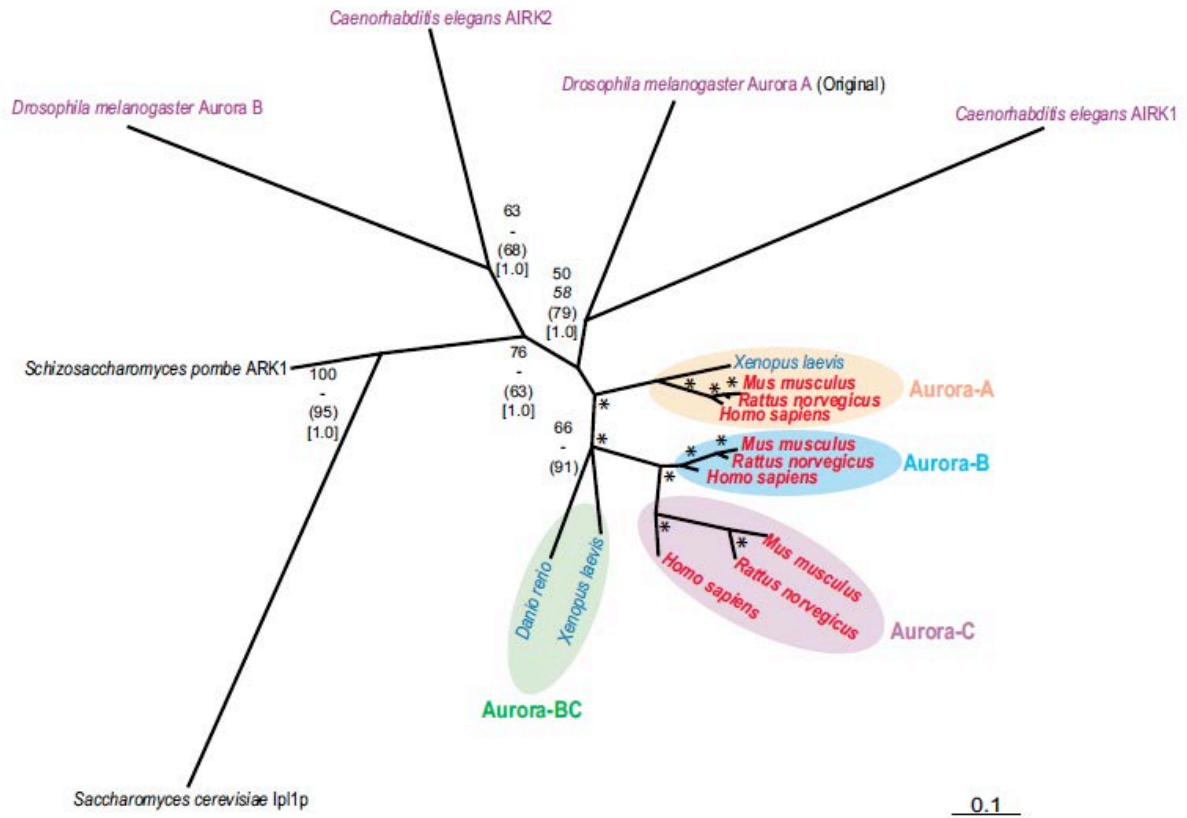


Figure 23: arbre phylogénétique des kinases « Aurora » chez différentes espèces. Echelle 0.1 (Brown et al., 2004).

Par exemple, la protéine TPX2 (targetting protein for Xklp2) interagit avec Aurora-A pour la localiser aux pôles du fuseau mitotique, et stimule l'autophosphorylation de la T288. TPX2 empêche aussi la déphosphorylation de la T288 par la phosphatase 1 (PP1) (Tsai et al., 2003 ; Bayliss et al., 2003). Nous aborderons la régulation de la kinase Aurora-A dans le chapitre suivant.

Quant à la kinase Aurora-B, elle colocalise avec son principal activateur, la protéine centromérique INCENP (inner centromere protein) et forment avec d'autres protéines telles que la Survivine et la Boréaline le complexe des protéines passagères des chromosomes, CPC (chromosomal passenger complex).

L'interaction entre INCENP et la kinase Aurora-B est requise pour la localisation de Aurora-B au centromère, au fuseau central et au sillon d'abscission (Adams et al., 2000). L'association de INCENP avec Aurora-B humaine provoque l'autophosphorylation de thréonine 248 de Aurora-B d'une manière identique à la phosphorylation de la T288 de Aurora-A par association avec TPX2 (Sessa et al., 2005). La kinase Aurora-B (AIR-2) phosphoryle aussi INCENP sur ses sérines 598 et 599 chez *C. elegans*. Cette phosphorylation est nécessaire pour la localisation de la kinase Aurora-B *in vivo* et renforce son activité kinase. Enfin, la faible expression de la kinase Aurora-B ou la diminution de son activité produit les mêmes phénotypes que la faible expression de INCENP chez plusieurs organismes (Bishop and Schumacher, 2002). Toutefois, l'activité de la kinase Aurora-B, Ipl1 (*S. cerevisiae*) et AIR-2 (*C. elegans*), est contre-balancée par la phosphatase 1 (GLC7/PP1) durant la mitose et la méiose. En effet, la phosphatase PP1 déphosphoryle l'histone H3 initialement phosphorylée sur sa sérine 10 *in vivo* (Hsu et al., 2000).

Enfin, l'activation de la kinase Aurora-C est similaire à la kinase Aurora-B. En effet, INCENP se lie à la kinase Aurora-C, et l'active *in vivo* et *in vitro*. Aurora-C

interagit également avec le CPC, elle participe à sa formation (Li et al., 2004) et se lie directement à la survivine (Yan et al., 2005). La surexpression de la kinase Aurora-C perturbe aussi la liaison de INCENP avec la kinase Aurora-B (Chen et al., 2005) suggérant un dosage très précis des deux kinases Aurora-B et Aurora-C *in vivo*.

Bien qu'ayant une forte homologie au niveau de leurs domaines kinases, les protéines kinases « Aurora » ont des niveaux d'activité enzymatiques différents. Par exemple, l'activité enzymatique de la kinase Aurora-B est 50 fois plus faible que celle de la kinase Aurora-A. Chez le xénope, la glycine 205 (G205) joue un rôle déterminant dans l'activité de la kinase Aurora-A et sa régulation par TPX2. Ainsi, la mutation de G205 en N, le résidu équivalent chez la kinase Aurora-B, n'a aucun effet sur l'autophosphorylation de sa boucle d'activation mais réduit de 10 fois son activité kinase. Le mutant Aurora-A G205N est activé par TPX2 mais la protection de la déphosphorylation de T295 par la phosphatase PP1 est supprimée. En revanche, la mutation de N158 de la kinase Aurora-B en G augmente de 350 fois l'activité spécifique de cette kinase (Eyers et al., 2005). De même, la mutation du résidu glycine G198 de la kinase Aurora-A humaine en asparagine pour mimer l'asparagine N142 de la kinase Aurora-B conduit à sa liaison à INCENP et non à TPX2. Le mutant Aurora-A G198N ainsi généré est non seulement capable de se localiser comme la kinase Aurora-B mais aussi de secourir ses fonctions en mitose (Fu et al., 2009 ; Hans et al., 2009). C'est sur la base de ce résidu G198 de la kinase Aurora-A que TPX2 discrimine la kinase Aurora-B (Bayliss et al., 2003). Par contre, la mutation réciproque de la kinase Aurora-B n'est pas capable de remplir les fonctions de la kinase Aurora-A (Hans et al., 2009). Néanmoins, le mutant Aurora-A G198N forme un complexe avec les partenaires de Aurora-B, INCENP et la survivine qui est requis

pour sa localisation. Ce mutant phosphoryle INCENP et la survivine *in vitro*. Enfin, c'est la présence d'une glycine ou d'une asparagine qui conférerait aux kinases Aurora-A et -B leurs partenaires respectifs ainsi qu'une localisation et des fonctions subcellulaires différentes (Fu et al., 2009).

2.4. Des partenaires communs aux kinases « Aurora »

Il arrive aussi que les kinases « Aurora » phosphorylent les mêmes protéines pour réguler le cycle cellulaire. C'est le cas par exemple de la protéine centromérique Cenp-A (un variant de l'histone H3) qui est successivement phosphorylée par les kinases Aurora-A et -B sur sa sérine 7 en prophase. Cette phosphorylation permet de localiser la kinase Aurora-B aux kinétochores et est impliquée dans la congression des chromosomes en prométaphase (Kunitoku et al., 2003). Slattery et al. (2008) ont aussi montré que la kinase Aurora-C phosphoryle Cenp-A.

De même, la kinésine motrice Cenp-E est phosphorylée par ces deux kinases « Aurora » sur ses thréonines 422 (Humaines) et 424 (xénope). Cette phosphorylation est requise pour l'alignement des chromosomes autour de la plaque métaphasique et pour la congression des chromosomes polaires. De plus, elle empêche la déphosphorylation de Cenp-E par la phosphatase PP1 établissant ainsi un phospho-switch qui stabilise Cenp-E (Kim et al., 2010).

Enfin, PLK1 (polo like kinase 1) interagit avec Aurora-A en interphase puis avec Aurora-B en mitose. La phosphorylation de PLK1 en fin de G2 sur sa sérine 210 par Aurora-A est requise pour l'entrée en mitose (Macurek et al, 2008 ; Seki et al., 2008). Durant la mitose, la dynamique des chromosomes et la transition métaphase-anaphase requerrait la formation d'un complexe entre Aurora-B et PLK1 aux kinétochores (Goto et al., 2006).

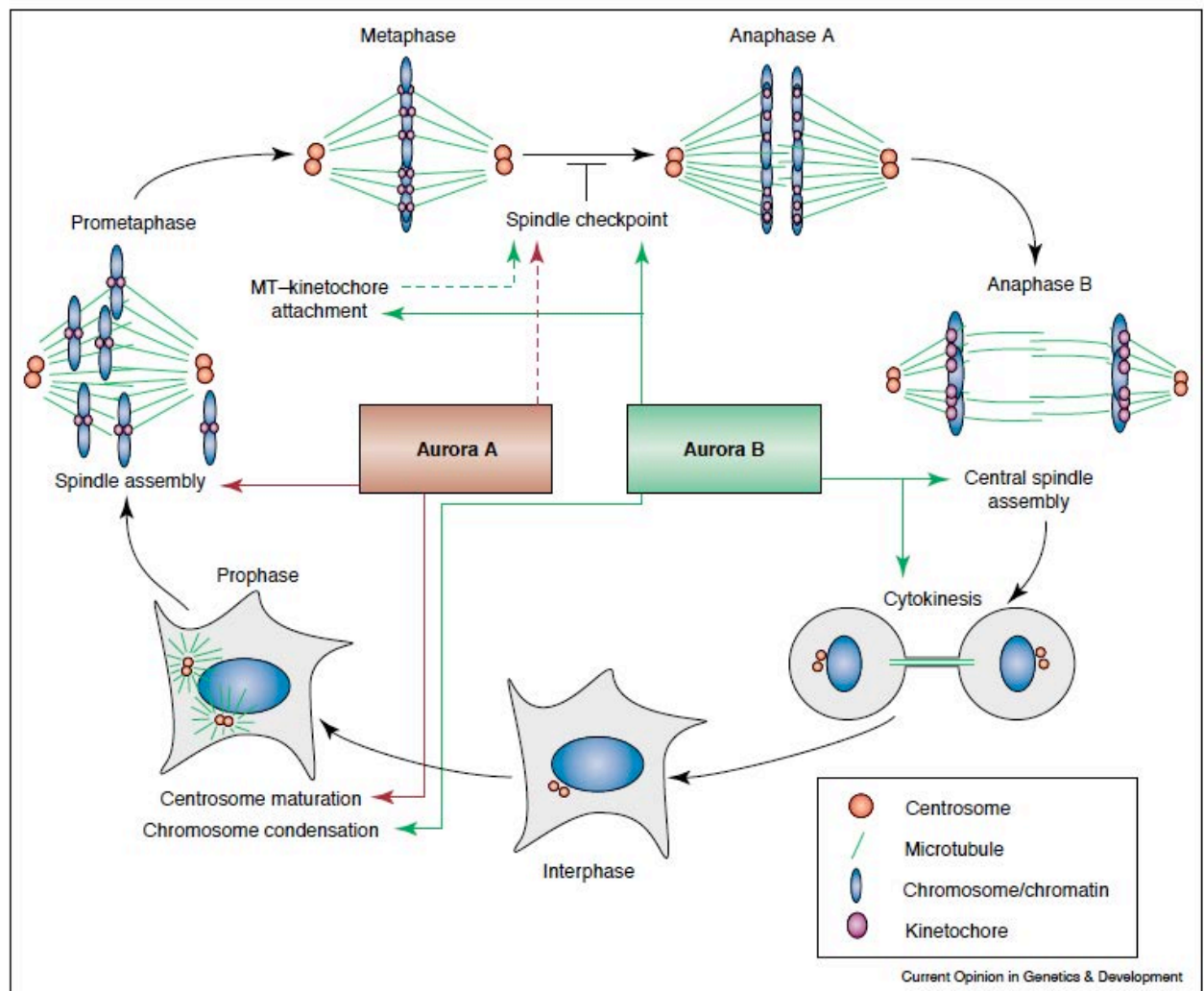


Figure 24: la localisation et quelques fonctions des kinases Aurora-A et -B au cours du cycle cellulaire (Meraldi et al., 2004).

2.5. Localisation subcellulaire des kinases « Aurora »

Compte tenu de la variabilité observée au niveau de leur domaine régulateur (N-terminal), les protéines kinases Aurora-A et -B, montrent des profils de localisation subcellulaire différents (**Figure 24**). A l'inverse, les protéines kinases Aurora-B et -C colocalisent ensemble et se complètent dans leurs fonctions mitotiques (Li et al., 2004 ; Sasai et al., 2004).

La protéine kinase Aurora-A est la kinase "Aurora polaire" (Carmena and Earnshaw, 2003) car elle se localise aux pôles du fuseau mitotique (Fu et al., 2007). Dès que les centrosomes sont dupliqués en fin de phase S, elle s'associe au matériel péricentriolaire. La protéine kinase Aurora-A est régulièrement renouvelée au niveau du matériel péricentriolaire à travers un échange avec le pool cytoplasmique (Berdnik and Knoblich, 2002 ; Katayama et al., 2003). Tout au long de la mitose, la protéine kinase Aurora-A présente une localisation subcellulaire très dynamique. On la trouve successivement aux centrosomes, aux pôles du fuseau, sur le fuseau central en anaphase et au midbody en télophase. Quelques rares études indiquent une localisation nucléaire avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD) (Hirota et al., 2003 ; Kunitoku et al., 2003). Nous aborderons la localisation de la kinase Aurora-A qui fait l'objet de notre étude de façon plus détaillée dans le chapitre suivant.

La protéine kinase Aurora-B constitue la partie catalytique du complexe des protéines passagères du chromosome (CPC) dont font partie INCENP (inner centromere protein), la survivine et la boréoline (**Tableau 5**) (Earnshaw and Bernat, 1991 ; Ruchaud et al., 2007).

Les premières localisations chromosomiques de la kinase Aurora-B ont été montrées, par immunofluorescence indirecte, dans des cellules de rat (Terada et al.,

Organism	INCENP	Aurora-B kinase	Survivin	Borealin/Dasra-B
Sc	Sli15	Ipl1	Bir1	–
Sp	Pic1	Ark1	Bir1/Cut17	–
Dm	Incenp	ial	Deterin	Borealin
Ce	ICP-1	AIR-2	BIR-1	CSC-1?
Xl	XINCENP	XAurora-B	XSurvivin	Dasra-A, Dasra-B
Gg	INCENP-I	Aurora-B	Survivin	Borealin-1, Borealin-2
Mm	INCENP-A	AIM-1	Survivin	Borealin-1, Borealin-2
Hs	INCENP	Aurora-B	Survivin	Borealin

Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Gg, *Gallus gallus*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Xl, *Xenopus laevis*.

Tableau 5 : Composants du complexe des protéines passagères du chromosome (CPC) chez diverses espèces animales (Ruchaud et al., 2007) : Chromosomal Passengers : Conducting cell division.

1998), chez *C. elegans* (Schumacher et al., 1998b), *X. laevis* (Adams et al., 2000) et *D. melanogaster* (Adams et al., 2001). L'analyse par photoblanchiment (Fluorescence Recovery After Photobleaching) de cellules de rat NRK (normal rat kidney) exprimant des formes GFP-Aurora-B a montré que la localisation de la kinase Aurora-B au centromère en métaphase est très dynamique. En effet, il existe un échange important entre les pools centromérique et cytoplasmique de la protéine. De fait, la kinase Aurora-B est "l'Aurora équatoriale" (Carmena and Earshaw, 2003) car elle est présente au cortex équatorial préparant les événements post-métaphase.

La localisation de Aurora-B comme celle de Aurora-A est très dynamique et varie au cours de la progression de la mitose. De la fin G2 jusqu'avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD), la kinase Aurora-B a une localisation exclusivement nucléaire. Dès la rupture de l'enveloppe nucléaire, de la prométaphase jusqu'à la métaphase en particulier, elle se concentre à la face interne du centromère où elle s'associe à ses partenaires du CPC (INCENP, Survivine, Boréoline). Après la ségrégation des chromosomes en anaphase, elle quitte les centromères pour se localiser exclusivement au fuseau central. Enfin, de la télophase jusqu'à la cytokinèse, la kinase Aurora-B se concentre fortement au midbody où elle sera dégradée en sortie de mitose (Schumacher et al., 1998b; Giet and Prigent, 1999 ; Adams et al., 2001; Giet and Glover, 2001 ; Murata-Hori et al., 2002 ; Carmena and Earshaw, 2003 ; Andrews et al., 2003 ; Fu et al., 2007).

La protéine kinase Aurora-C est, tout comme la kinase Aurora-B avec laquelle elle est très apparentée, une protéine passagère des chromosomes. Ceci a été démontré par quelques éloquentes études réalisées par immunofluorescence indirecte ou par vidéomicroscopie de cellules exprimant la kinase Aurora-C fusionnée à la GFP. Du début de la mitose jusqu'à la métaphase, elle reste fortement associée

à la face interne du centromère. Ensuite, elle se localise au fuseau central après la ségrégation des chromosomes durant l'anaphase. Enfin, elle se concentre au midbody dans les dernières phases de la mitose, de la télophase jusqu'à la cytokinèse (Li et al., 2004 ; Sasai et al., 2004 ; Yan et al., 2005). Toutefois, il avait été précédemment rapporté que la protéine kinase Aurora-C était associée aux centrosomes dans les phases tardives de la mitose. La localisation subcellulaire par Immunofluorescence indirecte avec un polyclonal purifié anti-AIK3 de la protéine kinase Aurora-C dans des cellules HeLa montre une position centrosomale en mitose ; de l'anaphase à la cytokinèse (Kimura et al., 1999). Ces résultats n'ont pas pu être reproduits dans le laboratoire (Prigent C communication personnelle).

Durant la méiose, la kinase Aurora-C a été détectée par immunofluorescence au centromère et le long des bras des chromosomes en prométaphase I-métaphase I et y est très concentrée en métaphase II. Ensuite, à la transition anaphase I - télophase I, la kinase Aurora-C est déphosphorylée et relocalisée au fuseau central et au midbody (Yang et al., 2010). Il faut signaler enfin que les kinases Aurora-B et -C se localisent non seulement de façon identique, mais ont aussi des fonctions mitotiques redondantes et un activateur (INCENP) commun, *in vivo* et *in vitro*. Il a été démontré, par exemple, que INCENP se lie et active Aurora-B et -C de la même manière, et par le même domaine de liaison de sa séquence nucléotidique (Li et al., 2004 ; Sasai et al., 2004).

2.6. Fonctions générales des kinases « Aurora »

Pendant longtemps, les fonctions de la kinase Aurora-A ont été associées au début de la mitose tandis que celles des kinases Aurora-B et -C ont été reliées aux phases tardives de la mitose (Figure 24). En effet, la kinase Aurora-A est requise

pour l'entrée en mitose à la transition G2/M. Elle est impliquée dans la maturation et la séparation des centrosomes en prophase. Egalement, elle joue un rôle essentiel dans la mise en place et la stabilité du fuseau bipolaire et à la congression des chromosomes en prométaphase. Par ailleurs, de récentes études montrent qu'elle serait aussi très active dans les phases tardives de la mitose. Nous aborderons les fonctions de cette kinase dans le chapitre suivant.

Quant à la kinase Aurora-B, elle est impliquée dans la régulation du point de contrôle du fuseau bipolaire (SAC) à la transition métaphase/anaphase (Biggins and Murray, 2001 ; Murata-Hori et al., 2002 ; Petersen and Hagan, 2003). En effet, la kinase Aurora-B participe au recrutement des protéines du checkpoint (MCC, mitotic checkpoint component) (Ditchfield et al., 2003). Elle est nécessaire à la ségrégation des chromatides sœurs en anaphase par la phosphorylation de l'histone H3 (Terada et al., 1998 ; Adams et al., 2001 ; Goto et al., 2000). Elle est fortement requise pour la cytokinèse, comme nous l'avons précédemment indiqué (Terada et al., 1998). De plus, elle joue un rôle important dans la condensation des chromosomes en sortie de mitose (interphase et G1), en phosphorylant l'histone H3 (Adams et al., 2001; Giet and Glover, 2001). La kinase Aurora-B phosphoryle l'histone H3 sur ses sérines 10 et 28 *in vivo* (Hsu et al., 2000 ; Goto, 2002 ; Sugiyama et al., 2002). Enfin, cette phosphorylation de l'histone H3 sur sa sérine 10, *in vivo*, est nécessaire à la dynamique des chromosomes. En outre, elle est requise pour la ségrégation et la condensation des chromosomes durant la mitose et la méiose (Wei et al., 1999).

La kinase Aurora-C serait-elle la copie conforme de la kinase Aurora-B ? Le fait que ces deux kinases aient une localisation subcellulaire identique et une forte homologie des séquences de leurs domaines kinase pourraient expliquer que leurs fonctions se chevauchent et sont redondantes durant la mitose. Par exemple, la

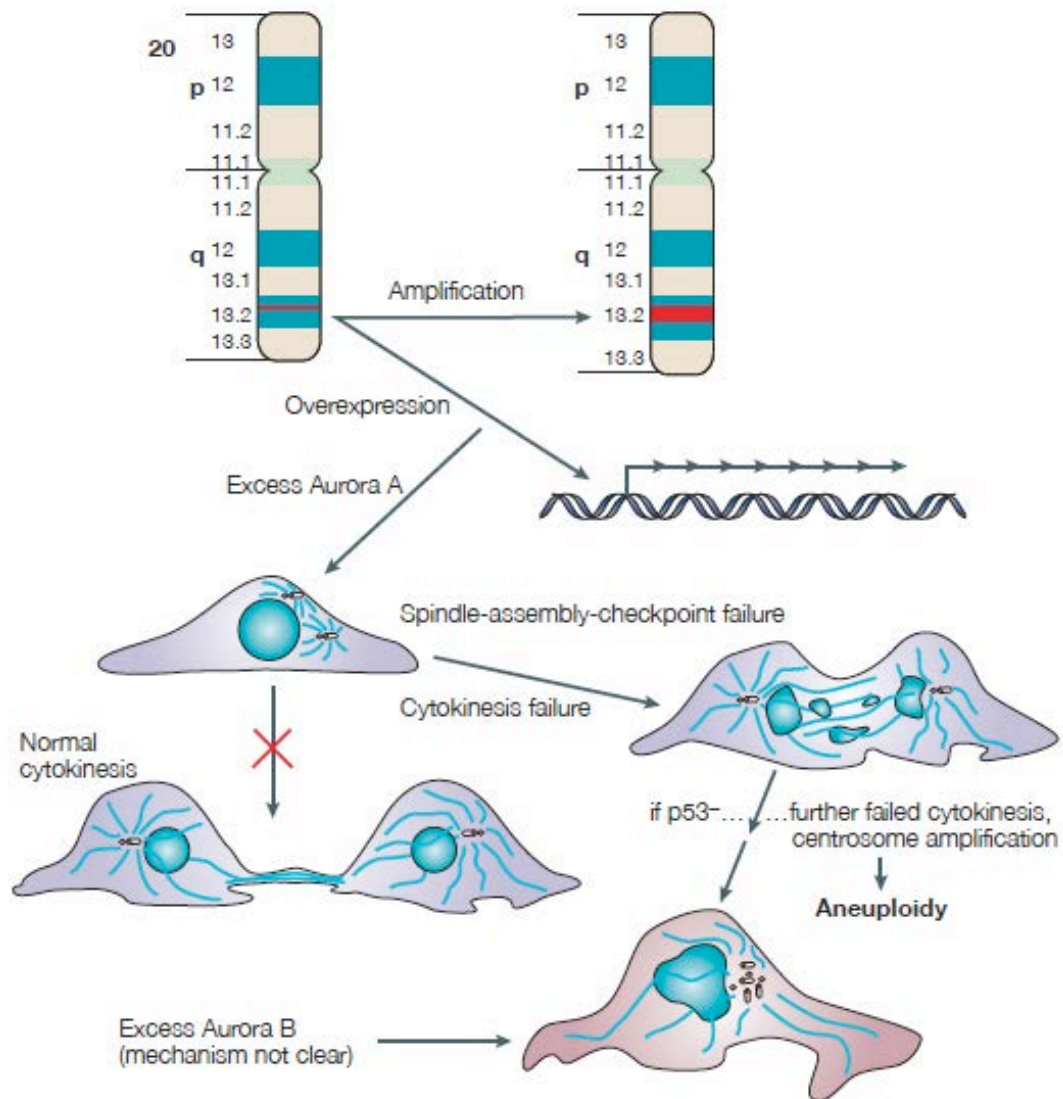


Figure 25 : conséquences de la surexpression de la kinase Aurora-A. L'amplification du gène 20q13 provoque la surexpression de la kinase Aurora A. Il en résulte une déstabilisation du fuseau mitotique, une augmentation du nombre des centrosomes et un défaut de cytokinèse. Ceci conduit à l'aneuploïdie comme dans le cas d'une surexpression de la kinase Aurora-B (Carmena and Earshaw, 2003).

surexpression de la kinase Aurora-C délocalise la kinase Aurora-B, et vice-versa (Sasai et al., 2004). Elle diminue par la même occasion le niveau d'expression de la kinase Aurora-B (Tsou et al., 2011). Egalement, l'expression du dominant négatif de la kinase Aurora-C (AurC-KD) bloque la localisation au centromère/kinétochore des kinases Aurora-B, Bub1 et BubR1. De même, elle empêche l'interaction INCENP/Aurora-B et diminue la phosphorylation de l'histone H3 (Chen et al., 2005 ; Yang et al., 2010). Tout comme la kinase Aurora-B, la kinase Aurora-C phosphoryle l'histone H3 en interphase (Li et al., 2004), Cenp-A et la boréaline durant la mitose (Slaterry et al., 2008). Et, en l'absence de la kinase Aurora-B, la kinase Aurora-C assure la localisation au centromère des protéines du CPC (Slaterry et al., 2008). Aussi, la kinase Aurora-C est capable de secourir les phénotypes mitotiques de la kinase Aurora-B, à savoir le défaut de cytokinèse et la multinucléation des cellules (Li et al., 2004 ; Sasai et al., 2004 ; Yan et al., 2005). Enfin, la kinase Aurora-C joue un rôle crucial en méiose, en particulier durant la spermatogénèse où elle est fortement requise pour la complétion de la cytokinèse. Par exemple, pendant la méiose des souris femelles, c'est la kinase Aurora-C et non la kinase Aurora-B qui joue le rôle essentiel (Yang et al., 2010).

2.7. Les pathologies liées aux kinases « Aurora »

Les kinases « Aurora » sont des régulatrices-clés du cycle cellulaire. Une perturbation de leurs activités conduit à une instabilité génétique, principale cause de cancers. Les régions chromosomiques où se localisent les gènes des kinases Aurora sont de régions fortement remaniées dans les cancers humains. Par exemple, l'amplification de la région 20q13 est associée au diagnostic d'un cancer de sein non ganglionnaire agressif (Isola et al., 1995) (Figure 25).

Par ailleurs, les protéines kinases « Aurora » ont été retrouvées surexprimées dans plusieurs tumeurs malignes chez les mammifères. La kinase Aurora-A est surexprimée au-delà de 50% dans les cas de cancers colorectaux, gastriques et des ovaires (Bischoff et al., 1998 ; Takahashi et al., 2000, Sakakura et al., 2001 ; Gritsko et al., 2003). En outre, cette surexpression a été observée dans 94% des cas d'adénocarcinomes invasifs du sein (Tanaka et al., 1999).

De même, la surexpression de la kinase Aurora-C a été détectée dans 51,3% des cas de cancers colorectaux (Takahashi et al., 2000). Globalement, Ullisse et al. (2006) ont trouvé que le niveau protéique des trois kinases « Aurora » était significativement plus élevé dans trois carcinomes papillaires thyroïdiens par rapport aux tissus normaux provenant des mêmes patients. Par conséquent, les kinases « Aurora » constitueraient une cible thérapeutique de premier choix dans le traitement des cancers thyroïdiens (Baldini et al., 2012).

Le caractère oncogène de la kinase Aurora-A a été démontré par plusieurs études. La surexpression de la kinase Aurora-A transforme les cellules NIH 3T3 et les fibroblastes de cellules RAT1. De plus, l'injection de ces cellules dans des souris immunodéficientes induit l'apparition de tumeurs (Zhou et al., 1998 ; Bischoff et al., 1998 ; Littlepage et al., 2002).

Deux études récentes ont permis de mettre en évidence le caractère oncogène de la kinase Aurora-C (Khan et al., 2011 ; Tsou et al., 2011). En effet, les résultats des analyses effectuées par Khan et al. (2011) ont montré que l'expression de la kinase hyperactive de Aurora-C (Aurora-C-T191D) dans des lignées stables NIH-3T3 occasionnaient leur transformation d'une part et, l'injection de clones NIH-3T3 stables exprimant la kinase hyperactive induit la formation de tumeurs chez les souris normales d'autre part. Enfin, ces auteurs ont trouvé que l'agressivité de ces

tumeurs était corrélée à la quantité de kinase hyperactive injectée dans l'organisme des souris. De son côté, Tsou et al. (2011) ont montré que la surexpression de la kinase Aurora-C augmente la prolifération, la transformation et la migration des cellules cancéreuses humaines. De plus, cette équipe indique que l'activité kinase de Aurora-C est requise pour ces propriétés associées aux tumeurs. Enfin, l'absence de la kinase Aurora-C provoquerait l'infertilité chez les mâles. Elle se manifeste par la production de spermatozoïdes polyploïdes, multiflagellaires et macrocéphales (Dieterich et al., 2007). Cette infertilité serait due à une mutation délétère homozygote (c.144delC) du gène de Aurora-C (Harbuz et al., 2009).

Contrairement aux kinases Aurora-A et -C, la kinase Aurora-B n'est pas considérée comme un oncogène classique. Bien que retrouvée surexprimée dans plusieurs types de cancers, l'augmentation de l'activité kinase de Aurora-B n'induit pas directement la transformation cellulaire. Néanmoins, l'élévation de l'activité kinase de Aurora-B renforce la voie de signalisation médiée par l'oncogène Ras. De plus, elle convertit des cellules normales en cellules aneuploïdes (Kanda et al., 2005). Enfin, Tatsuka et al., (1998) ont montré que la surexpression de l'activité kinase de Aurora-B conduirait à la multinucléation et l'augmentation de la ploïdie des cellules, facteurs prédisposant à la tumorigénèse cellulaire.

De tout ce qui précède, il reste évident que les protéines kinases « Aurora » sont des cibles idéales dans la thérapie des cancers. En effet, ces kinases sont non seulement des régulatrices clés du cycle cellulaire mais aussi des inductrices et/ou potentialisatrices de tumeurs (voir article en annexe).

Chapitre 3 : Etude de la kinase Aurora-A

Depuis sa découverte en 1995 par l'équipe de Glover (Glover et al., 1995) jusqu'à nos jours, la sérine/thréonine kinase Aurora-A a fait l'objet de plusieurs études qui ont permis de mettre en évidence, par exemple, son rôle indispensable dans l'entrée en mitose, sa localisation et son mode de régulation au cours du cycle cellulaire, ses différentes implications dans le processus de tumorigénèse des cellules (elle se comporte à la fois comme oncogène et suppresseur de tumeurs), et son potentiel rôle pharmacologique en tant que cible dans la thérapie des cancers. Dans cette partie du mémoire de thèse, nous aborderons de façon spécifique l'étude de la protéine kinase Aurora-A depuis son expression génique jusqu'à son action dans la cancérogénèse.

3.1. Du gène à l'expression de la protéine

La transcription du gène de Aurora-A se fait sous la dépendance d'un promoteur possédant une séquence PRE (positive regulatory element) de type CTTCCGG essentielle pour l'activité transcriptionnelle (Tanaka et al., 2002). En aval de cette séquence de liaison aux protéines se trouve une séquence tandem d'éléments répresseurs CDE (cell-cycle-dependent element) et CHR (cell-cycle gene homology region) qui régule la transcription spécifique du gène Aurora-A en G2 (Kimura et al., 1997 ; Tanaka et al., 2002). La mutation de cette séquence tandem, CDE/CHR, induit une perte de l'activité du promoteur et, par conséquent, un défaut de régulation du cycle cellulaire (Tanaka et al., 2002). Enfin, cette équipe a montré que la transcription de Aurora-A est positivement régulée par le facteur de transcription E4TF1 qui appartient à la famille des protéines régulatrices Ets (E26 transformation-specific). La coexpression des deux hétérodimères de E4TF1

(E4TF1-60 et E4TF1-53) augmente considérablement l'activité du promoteur Aurora-A.

Par ailleurs, l'expression de Aurora-A est aussi régulée par le facteur de transcription c-Myc. En effet, Courapied et al. (2010) ont montré par des analyses d'immunoprécipitation de chromatine que c-Myc et son partenaire de liaison Max sont associés au promoteur de Aurora-A au cours de la phase G2 du cycle cellulaire. De plus, par ARN interférence cette équipe a montré que c-Myc est impliquée dans la régulation du gène de Aurora-A.

Les transcrits du gène Aurora-A (AURKA) sont très abondants dans des cellules mitotiquement et méiotiquement actives (Kimura et al., 1997 ; Bischoff et al., 1998). Les niveaux d'expression des ARN messagers et de la protéine kinase Aurora-A sont faibles durant les phases G1 et S. Cependant, ils augmentent considérablement durant la phase G2 pour atteindre le pic à la transition G2/M. Puis, ces niveaux d'expression chutent drastiquement à la sortie de la mitose et pendant la phase G1 du cycle cellulaire suivant (Kimura et al., 1997 ; Farrugio et al., 1999 ; Bischoff et al., 1998 ; Katayama et al., 2003). Il existe une forte corrélation entre le niveau d'expression de la protéine et son activité kinase pendant la mitose. Plus le niveau d'expression de la protéine est élevé plus son activité kinase l'est aussi (Katayama et al., 2003).

3.2. Régulation de l'activité de la kinase Aurora-A

L'activité de la kinase Aurora-A au cours du cycle cellulaire est régulée par des phénomènes de phosphorylation et déphosphorylation (Giet and Prigent, 1999, Walter et al., 2000). Pour ce faire, la kinase Aurora-A se lie à ses activateurs pour être active. Ensuite, elle phosphoryle et active à son tour ses substrats dont certains

Cofactor	Function	Mechanism
Pak1	Activating kinase	Activates kinase activity by phosphorylating Thr288 residue in the activation loop
GSK3 β	Activating kinase	Activates kinase activity by phosphorylating Ser349
TPX2	Activator protein	Autophosphorylation at Thr288 and protects from PP1 γ
HEF1	Activator protein	Stimulates autophosphorylation at Thr288
Ajuba	Activator protein	Stimulates autophosphorylation at Thr288
Bora	Activator protein	Stimulates autophosphorylation at Thr288
Inh2	PP1 γ inactivating protein	Binds PP1 γ and inactivates it, indirectly maintains Aurora A kinase in active form
AURKIP1	Proteosomal degradation pathway member	Leads to ubiquitin independent 20S proteosomal degradation
Chfr1	Proteosomal degradation pathway member	Aids in ubiquitin-dependent 28S proteosomal degradation
Cdh1	Proteosomal degradation pathway member	Aids in ubiquitin-dependent 28S proteosomal degradation

Tableau 6 : protéines régulatrices de l'activité de la kinase Aurora-A (Karthigeyan et al., 2010). Ce tableau présente les fonctions des cofacteurs de Aurora-A ainsi que leur mécanisme d'interaction avec Aurora-A.

comme TPX2 la protègent de la déphosphorylation par les phosphatases (PP1 ou PP2A par exemple) (Eyers et al., 2003 ; Glover, 2003 ; Tsai et al., 2003 ; Eyers et al., 2005). Les différentes protéines qui interagissent avec Aurora-A au cours du cycle cellulaire sont présentées dans les **Tableaux 6 et 7** (Karthigeyan et al., 2010).

3.2.1. Phosphorylation/activation de la kinase Aurora-A

L'activation de la kinase Aurora-A humaine requiert une autophosphorylation de sa thréonine 288 (thréonine 295 chez le xénope) située au niveau de sa boucle d'activation dans le domaine N-terminal de la séquence nucléotidique de la kinase (Walter et al., 2000 ; Littlepage et al., 2002a). Le traitement de cellules HeLa par l'acide okadaïque induit la phosphorylation de la thréonine T288 de la kinase Aurora-A. Cette phosphorylation s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la kinase. Enfin, la protéine phosphatase 1 est capable de déphosphoryler ce résidu T288 (Walter et al., 2000). Chez le xénope, la thréonine 295 appartient à la séquence consensus de phosphorylation de la kinase Aurora-A (... RRTT₂₉₅L ...) (Pascreau et al., 2008). Le laboratoire a pu montrer clairement que la thréonine 295 était le seul site d'autophosphorylation de la kinase Aurora-A ce, en l'absence d'autres kinases, partenaires ou substrats de la kinase Aurora-A. Par ailleurs, Cheeseman et al. (2002) indiquent que la séquence consensus de type [KR]X [TS][ILV] de la kinase Aurora-A de la levure située au niveau de la boucle d'activation était très conservée parmi les mammifères.

Cependant, cette autophosphorylation (pThr288 ou pThr295) ne permet pas d'activer complètement la kinase Aurora-A. Pour ce faire, elle doit interagir avec TPX2, une protéine associée aux microtubules (Wittmann et al., 2000). TPX2 provoque l'autophosphorylation de Aurora-A qui devient active (**Figure 26**) (Bayliss et

Interacting protein/substrate	Modified residue	Functional significance
Centrosomin	None (kinase independent interaction)	Independent of kinase activity, it interacts with Aurora A and aids in centrosome maturation
Lats2	Ser83	Centrosome maturation
ASAP	Ser625	Bipolar spindle assembly
NDEL1	Ser251	Microtubule reorganization, centrosomal separation, and maturation
MBD3	Ser24	Not discovered
TACC3	Ser558	Regulates XMAP215
XMAP215		Stimulates microtubule growth
MCAK	Ser196	Microtubule depolymerase activity loss
	Ser719	Microtubule depolymerase activity enhanced
SPD2	Not determined	Recruits SPD5 and aids in centrosome maturation
Eg5	Ser543	Kinesin-like protein for microtubule organization
Cdc25B	Ser353	Mitotic entry
BRCA1	Ser308	Microtubule nucleation
RASSF1A	Thr202 and/or Ser203	M phase progression upon phosphorylation
Par6		NUMB localization during cell division
P160ROCK	Not determined	Centrosome positioning and mitotic exit
P53	Ser215	Abrogates transactivation
	Ser315	Abrogates transactivation as well as enhances proteosomal degradation
I κ B α	Ser32 and Ser36	NF κ B activation upon phosphorylation
CFos	Not determined	Unknown
HDAC6	Not determined	Ciliary resorption
CENP-A	Ser7	Kinetochores organization
Gsk3 β	Ser9	Enhances β -catenin activity
CPEB	Ser174	Oocyte maturation
Plk1	Thr210	Centrosomal organization
HURP	Ser627, Ser725, Ser757, Ser830	Serum-independent growth property is attained on phosphorylation
N-Myc	None (kinase-independent interaction)	Stabilization of n-Myc upon interaction with Aurora A by inhibiting SCF ^{Fbxw7} proteins interactions

Tableau 7 : substrats et partenaires de la kinase Aurora-A (Karthigeyan et al., 2010).

Ce tableau présente les sites de phosphorylation et leurs rôles des partenaires et substrats de Aurora-A.

al., 2003 ; Eysers et al., 2003 ; Glover, 2003 ; Tsai et al., 2003 ; Eysers et al., 2005). En outre, l'interaction de la kinase Aurora-A avec TPX2 protège la boucle d'activation (T loop) en empêchant la déphosphorylation de la thréonine 288 par les phosphatases PP1, PP2A ou PP6 (Eysers et al., 2003 ; Glover, 2003 ; Tsai et al., 2003 ; Eysers et al., 2005 ; Zeng et al., 2010). Cette protection passe par un changement de conformation de la boucle d'activation de la kinase Aurora-A (Bayliss et al., 2003 ; Tsai et al., 2003). De même, l'activation de la kinase Aurora-A par TPX2 empêche l'inhibition de l'activité kinase de Aurora-A par p53 (Eysers and Maller, 2004).

C'est le domaine N-terminal de TPX2 qui active la kinase Aurora-A. En retour, la kinase Aurora-A phosphoryle trois résidus sérines (S48, S90 et S94) de TPX2 (Eysers and Maller, 2004). TPX2 s'associe avec la kinase Aurora-A en deux endroits. Les résidus d'acides aminés allant de 7 à 21 de TPX2 se lient à l'extrémité du lobe N-terminal de la kinase Aurora-A tandis que les résidus 30 à 40 forment une courte hélice (α C) qui se loge entre le lobe N-terminal et la boucle d'activation (T loop). Cette interaction génère des changements de conformation de la boucle d'activation de la kinase Aurora-A conduisant à une conformation totalement active. Ainsi, les interactions clés s'établissent entre le résidu thréonine phosphorylé (pThr288) de la boucle d'activation et les résidus arginines Arg255 et Arg180 de l'hélice α C et Arg286. De même, la thréonine 292 (Thr292) interagit avec le résidu Asp256 (**Figure 27a**). Par conséquent, le groupe phosphate de la thréonine 288 devient inaccessible pour les phosphatases (**Figure 27c**). En revanche, si la kinase Aurora-A n'interagit pas avec TPX2, la boucle d'activation devient accessible aux phosphatases pour déphosphoryler le résidu pThr288 (**Figure 27b**) (Bayliss et al., 2003, Bayliss et al., 2012).

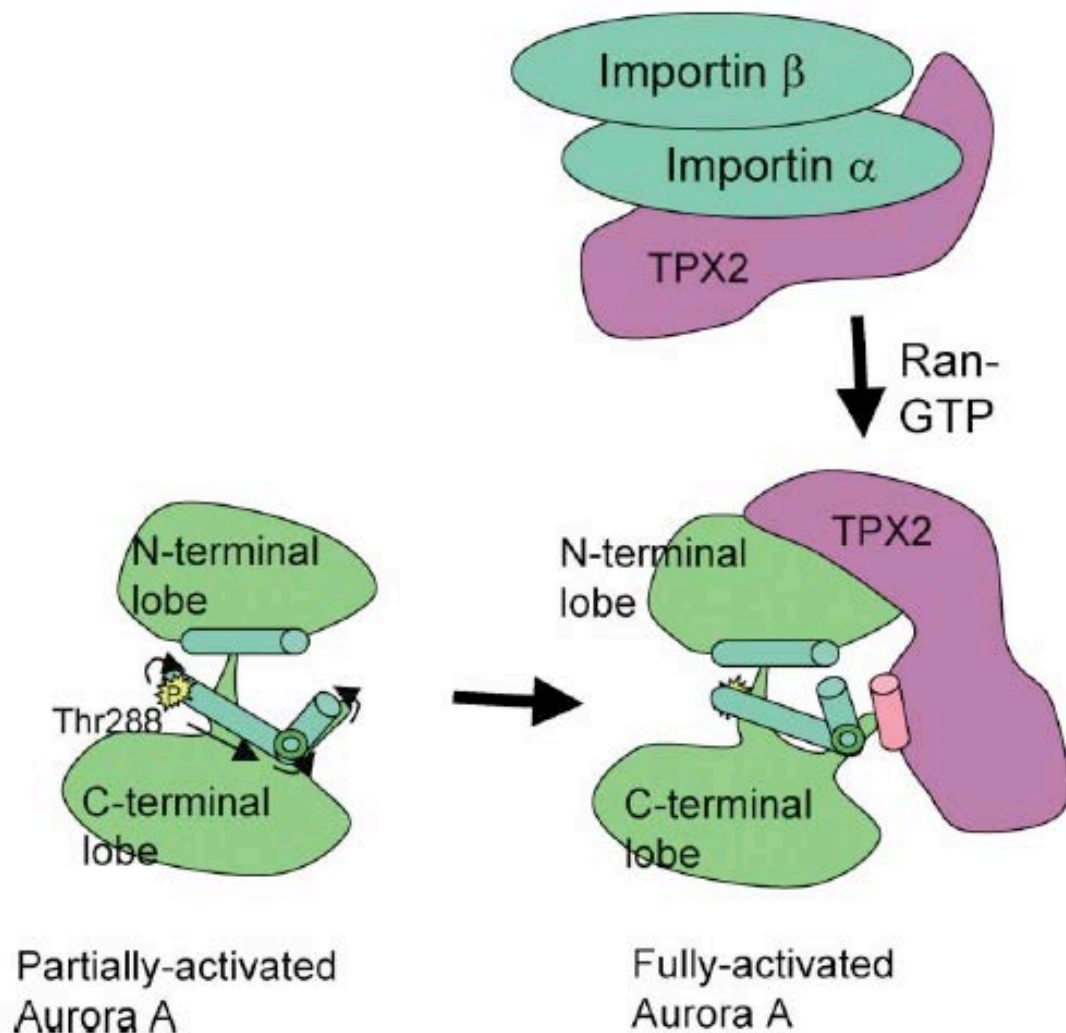


Figure 26: activation de la kinase Aurora-A par TPX2

La libération de TPX2 de son complexe avec les importin α et β par Ran-GTP permet sa liaison avec deux régions du domaine N-terminal de la kinase Aurora-A autophosphorylée sur sa thréonine 288. Cette interaction conduit à un changement de conformation au niveau de la boucle d'activation (T loop) qui bloque la déphosphorylation de la thréonine 288 par la phosphatase PP1. Ceci favorise ainsi l'activation complète de la kinase Aurora-A (Glover, 2003).

Cependant, il semble que c'est la phosphatase PP6, et non la phosphatase PP1, qui est le régulateur clé du niveau de phosphorylation de la kinase Aurora-A par TPX2. Cette phosphatase (PP6) est capable même de dissocier le complexe formé entre la kinase Aurora-A et TPX2 (Zheng et al., 2010). En dehors de TPX2, la kinase Aurora-A est activée par d'autres protéines telles que Ajuba, PP2A et Bora (Hirota et al., 2003 ; Satinover et al., 2004 ; Hutterer et al., 2006). Par exemple, Ajuba qui est une protéine du groupe des protéines structurelles LIM (Lin11, Isl-1 and Mec-3) se lie et active la kinase Aurora-A en fin de G2 au niveau des centrosomes (Hirota et al., 2003). La protéine Bora qui a une localisation nucléaire en interphase active la kinase Aurora-A à l'entrée en mitose dans le cytoplasme (Hutterer et al., 2006). Quant à l'interaction entre la kinase Aurora-A et la phosphatase PP2A, elle renforce l'activité de la kinase Aurora-A. En outre, la phosphatase inhibitrice PP2A (Glc8 chez la levure) est capable d'activer la kinase Aurora-A indépendamment de TPX2 en inhibant la phosphatase PP1 (Satinover et al., 2004). Egalement, la protéine HEF1 active la kinase Aurora-A dans les centrosomes (Pugacheva and Golemis, 2005).

Bien qu'étant directement impliquée dans l'activité kinase de Aurora-A, la phosphorylation du résidu thréonine 288 n'est pas la seule voie de régulation de la kinase (**Figure 27b**) (satinover et al., 2004 ; Pascreau et al., 2008 ; Dodson and Bayliss, 2012 ; Reboutier et al., 2012 ; Bayliss et al., 2012). En effet, la kinase Aurora-A est séquentiellement activée par plusieurs cofacteurs pour jouer des rôles spécifiques (Reboutier et al., 2012). Reboutier et al. (2012) ont montré que la nucléophosmine (NPM) provoque la stimulation de la kinase Aurora-A au centrosome en provoquant l'autophosphorylation de la sérine 89 de Aurora-A. Cependant, le laboratoire a aussi montré que l'association de la kinase Aurora-A

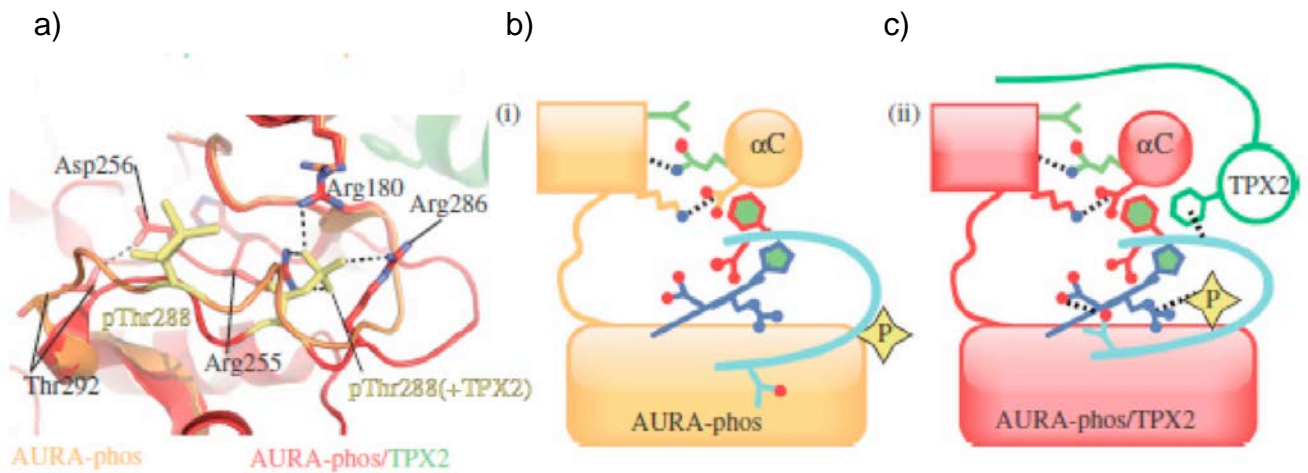


Figure 27: phosphorylation de la kinase Aurora-A avec ou sans TPX2 (Bayliss et al., 2012).

a) Superposition des structures cristallines de la forme phosphorylée de la kinase Aurora-A seule (orange) et celle liée à TPX2 (rouge). La thréonine 288 phosphorylée (pThr288) seule ou en présence de TPX2 (+TPX2) est représentée en jaune. Les interactions majeures sont indiquées en pointillés.

(b) Schéma montrant la forme phosphorylée de la kinase Aurora-A seule (en jaune)

(c) Schéma montrant la kinase Aurora-A phosphorylée par TPX2.

On observe un changement de conformation de la boucle d'activation avec la phosphorylation de la kinase Aurora-A par TPX2 (a) contrairement à (b). C'est ce changement de conformation qui permet de protéger le site phosphorylé (étoile en jaune) de la déphosphorylation par la phosphatase 1.

avec la nucléophosmine ne protège pas la kinase contre une déphosphorylation par la phosphatase 1 (contrairement à TPX2).

Par ailleurs, la phosphorylation de certains résidus de la kinase Aurora-A peut induire une perte d'activité de la kinase comme la phosphorylation de la sérine S349 chez le xénope (sérine 342 de la kinase humaine). La micro-injection d'un mutant non phosphorylable de la kinase Aurora-A (S349A) dans des ovocytes de xénopes au stade VI en réponse à la progestérone réduit rapidement et considérablement l'activité de la kinase Aurora-A (Pascreau et al., 2008). De plus, les résultats de cette équipe montrent que la phosphorylation de sérine 349 de la kinase Aurora-A est requise pour réguler l'activité de la kinase durant la maturation ovocytaire. Enfin, la sérine S349 (sérine 342 de la kinase humaine) est proche de l'un des deux sites fonctionnels de liaison de la kinase Aurora-A à la phosphatase PP1. L'interaction entre la kinase Aurora-A et la protéine phosphatase I (PP1) régule par rétroaction les phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation de la kinase au cours de la mitose (Katayama et al., 2001).

Enfin, la perte d'activité de Aurora-A peut être obtenue en utilisant des inhibiteurs chimiques. Cependant, force est de constater que ces molécules sont dans l'ensemble des inhibiteurs pan Aurora compte tenu de la forte homologie entre les kinases de la famille « Aurora» (**Tableau 8**).

3.2.2. Stabilité de l'activité kinase de Aurora-A

L'autophosphorylation de la kinase Aurora-A induite par TPX2 servirait à stabiliser la boucle d'activation de la kinase (Walter et al., 2000 ; Bayliss et al., 2003 ; Bayliss et al., 2012). Ainsi, la kinase Aurora-A active se trouve dans une conformation compatible avec la protéine de liaison au substrat (**Figure 28**).

Inhibitor	AURKA inhibition	AURKB inhibition	AURKC inhibition	Manufacturer	Clinical status
AZD1152	+	+	–	Astra Zeneca	Phase I
VX-680	+	+	+	Vertex/Merck	Discontinued
MLN8054	+	+	–	Millennium	Discontinued
MLN8237	+	+	–	Millennium	Phase II
PHA-680632	+	+		Nerviano	Preclinical
PHA-739358	+	+	+	Nerviano	Phase II
Hesperidin	–	+	–	Boehringer-Ingelheim	Preclinical
ZM447439	+	+	–	Astra Zeneca	Phase I
JNJ-770621	+	+	–	Johnson & Johnson	Preclinical
SU6668	+	+	–	Pfizer	Discontinued
CCT129202	+	+	+	Chroma Therapeutics Ltd.	Preclinical
AT9283	+	+	–	Astrex Therapeutics	Phase I
MP529	+	+	–	SuperGen	Preclinical
SNS314	+	+	+	Sunesis Pharmaceuticals	Phase I
R763	–	+	–	Rigel Pharmaceuticals	Phase I
ENMD2076	+	+	–	EntreMed	Phase I
XL228	+	+	+	Exelixis	Phase I
TTP607	+	+	+	TransTech Pharma	Phase I
PF-03814735	+	+	–	Pfizer	Phase I
CYC116	+	+	+	Cyclacel	Phase I

Tableau 8 : inhibiteurs des kinases « Aurora-A » (Dar et al., 2010).

Ce tableau présente les inhibiteurs des kinases Aurora, leurs fabricants ainsi que leurs statuts cliniques.

Egalement, le résidu phosphorylé (T288) est protégé de la déphosphorylation par les phosphatases grâce à ce changement de conformation qui empêche la captation du phosphate au niveau du groupe phosphate de la boucle d'activation (Bayliss et al., 2003 ; Bayliss et al., 2012). En effet, la structure cristalline de la kinase Aurora-A phosphorylée montre que sa boucle d'activation n'adopte pas une conformation semblable à celle de la kinase active. Le groupe phosphate de la thréonine Thr288 n'interagit pas avec l'arginine 255 (Arg255) du motif HRD et la thréonine 292 (Thr292) ne se lie pas de façon étendue avec l'acide aspartique Asp256 du motif HRD. La stabilisation définitive est obtenue quand la kinase Aurora-A interagit avec TPX2.

Les motifs HRD et DFG sont caractéristiques des domaines catalytiques des protéines kinases dont ils définissent le devenir. Les acides aspartiques contenus dans ces motifs sont essentiellement des résidus catalytiques. Par exemple, le résidu aspartate du motif HRD agit comme catalyseur de bases qui déprotone (enlève un ion H^+) la chaîne latérale du substrat sérine/thréonine. Cette région de la kinase est parfois désignée comme la boucle catalytique. Quant à l'aspartate du motif DFG, il coordonne un ion magnésium qui active le phosphate en position gamma de l'ATP. Cette région des kinases est souvent appelée la boucle de liaison au magnésium (Mg^{2+}) (Gibbs and Zoller, 1991 ; Bayliss et al., 2012).

Par ailleurs, Fumoto et al. (2008) indiquent que la protéine AIP1 interagit avec la kinase Aurora-A dans les centrosomes en début de mitose. Cette interaction permet de réguler la stabilité de la kinase Aurora-A en coordination avec la sérine/thréonine kinase GSK-3beta (Glycogen synthase kinase-3 beta).

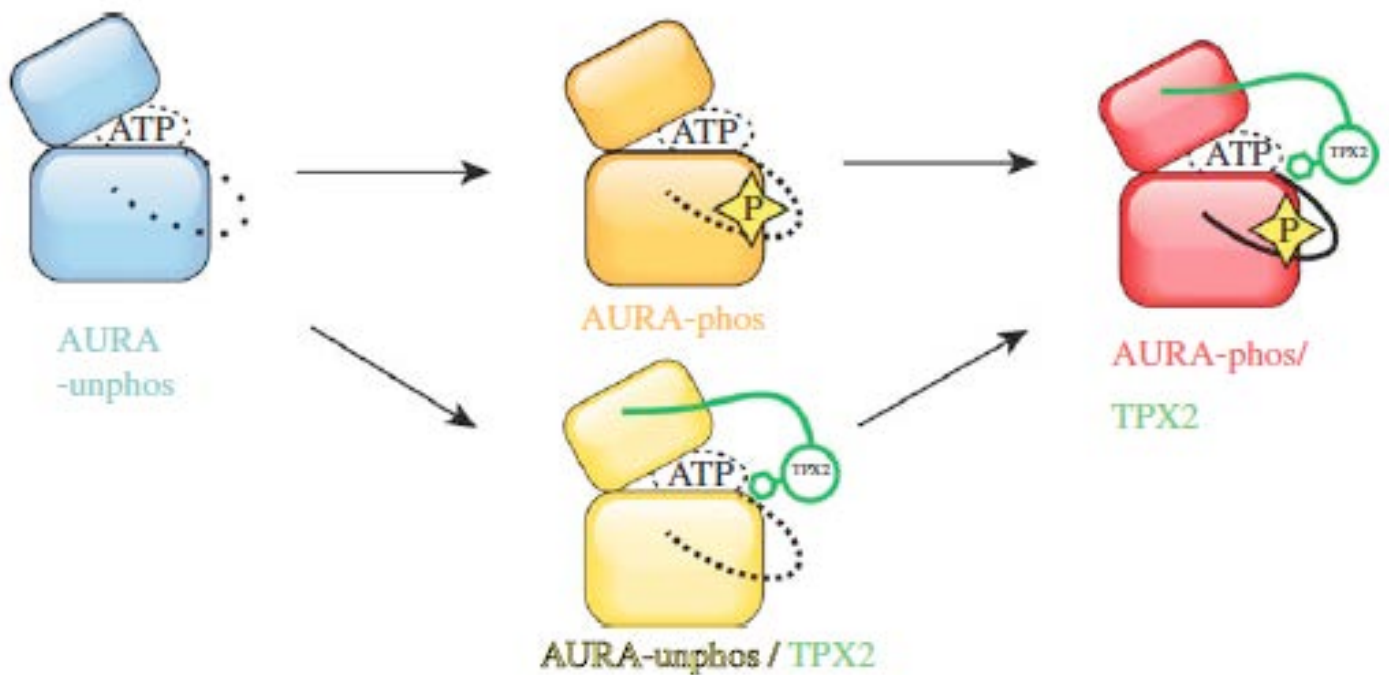


Figure 28: Modèle d'activation de Aurora-A en deux étapes (Bayliss et al., 2012).

Schéma du mécanisme d'activation en deux étapes de la kinase Aurora-A basé sur les structures cristallines de la forme non phosphorylée (AURA-unphos, bleu), de la forme phosphorylée (AURA-phos, orange) et de la forme phosphorylée en complexe avec TPX2 (AURA-phos/TPX2, rouge). Il n'y a actuellement pas de structure cristalline de Aurora-A non phosphorylée liée à TPX2 (jaune). Le segment d'activation de Aurora-A non phosphorylée est partiellement désordonné. Le segment d'activation de la forme phosphorylée de Aurora-A est ordonné, mais dans une conformation inactive incompatible avec la protéine de liaison au substrat. L'addition de TPX2 met le segment d'activation dans une conformation compatible avec la protéine de liaison au substrat.

3.2.3. Dégradation de la kinase Aurora-A

La kinase Aurora-A est dégradée en sortie de mitose par l'APC/C (anaphase promoting complexe/cyclosome), une ubiquitine ligase E3. Cette destruction se fait en particulier par l'intermédiaire de Cdh1, une sous-unité activatrice de l'APC/C, qui cible et dégrade la kinase Aurora-A en fin de mitose et en début de G1 (Arlot-Bonnemains et al., 2001 ; Taguchi et al., 2002 ; Crane et al., 2004).

En effet, la reconnaissance de la kinase Aurora-A par APC/Cdh1 nécessite deux domaines de la séquence nucléotidique de cette kinase : la boîte de destruction (D-box) du domaine C-terminal et la A-box II du domaine N-terminal. Ce signal de reconnaissance très conservé parmi les vertébrés présente une sérine en position 53 dans la kinase Aurora-A de xénope et en position 52 dans la kinase humaine (Castro et al., 2002a ; Castro et al., 2002b ; Littlepage et al., 2002b ; Katayama et al., 2003). Et, la déphosphorylation de cette sérine dans la kinase de xénope induit la dégradation de la kinase Aurora-A (Carmena et al., 2009).

Il existe d'autres voies de dégradation de Aurora-A indépendantes de l'APC/C. Par exemple, la protéine FBXW7 (hCDC4/hAGO/SEL10), une sous-unité de l'ubiquitine ligase E3 (Skp1-CUL1-F-box) régulerait la dégradation de Aurora-A au protéasome (Hagedorn et al., 2007). De même, l'interaction de la kinase Aurora-A avec AIP1 conduit à la dégradation de la kinase Aurora-A par la voie du protéasome (Kiat et al., 2002 ; Lim et al., 2007).

De tout ce qui précède, nous voyons que la régulation de la kinase Aurora-A nécessite son interaction avec plusieurs autres protéines au cours du cycle cellulaire (Karthigeyan et al., 2010). Cette interaction est indispensable à sa très dynamique distribution subcellulaire et à ses nombreuses fonctions en mitose et en méiose.

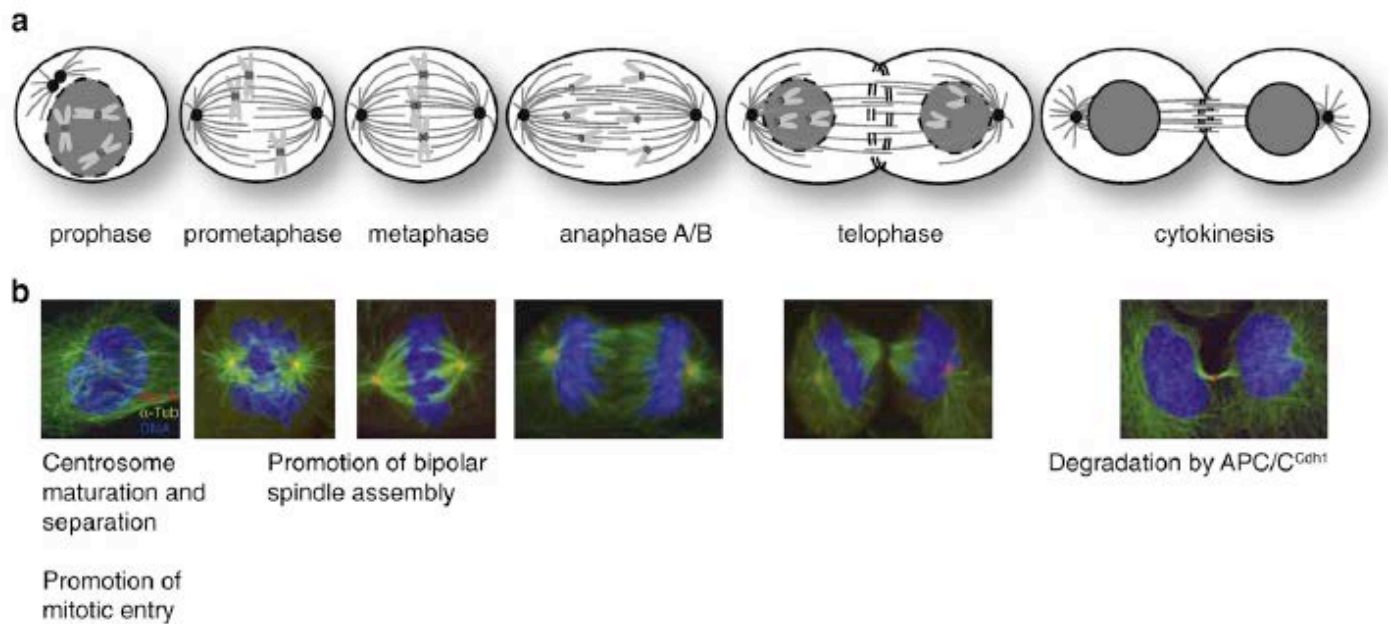


Figure 29: localisation de la kinase Aurora-A au cours des différentes sous-phases de la mitose ainsi que ses fonctions en début de mitose. a) Schéma des sous-phases de la mitose. b) Détection de la localisation en mitose par immunofluorescence de la kinase Aurora-A. L'ADN est représenté en bleu, Aurora-A en rouge et α -tubulin en vert (Vader and Lens, 2008).

3.3. Localisation de la protéine

La protéine kinase Aurora-A présente une localisation très dynamique au cours du cycle cellulaire. La détection par immunofluorescence indirecte de la protéine kinase Aurora-A montre qu'elle est associée aux centrosomes depuis leur duplication en interphase (phase S) jusqu'à la sortie de la mitose même si son niveau d'expression varie considérablement au cours du cycle cellulaire (Gopalan et al., 1997 ; Kimura et al., 1997a, Bischoff et al., 1998 ; Roghi et al., 1998 ; Schumacher et al., 1998a ; Zhou et al., 1998 ; Giet et al., 1999 ; Giet et al., 2002 ; Katayama et Al., 2003).

En plus de cette localisation centrosomale préférentielle, la kinase Aurora-A se localise au fuseau en mitose et est fortement enrichie aux pôles du fuseau bipolaire durant la mitose. Ainsi, de sa position centrosomale en prophase, elle se propage aux pôles du fuseau mitotique et sur le fuseau bipolaire de la prométaphase jusqu'en télophase. Bien qu'elle soit présente sur les microtubules polaires en mitose, elle n'est pas détectable sur les microtubules interphasiques. De même, la kinase Aurora-A est absente des microtubules astraux (Gopalan et al., 1997 ; Kimura et al., 1997a, Bischoff et al., 1998 ; Roghi et al., 1998 ; Giet et al., 1999). Cependant, elle régule les microtubules astraux par le biais de D-TACC (TACC3 humaine) qu'elle phosphoryle aux centrosomes (Giet et al., 2001). Par contre, la localisation de la kinase Aurora-A sur le fuseau requiert son interaction avec TPX2 (Kufer et al., 2002). A partir de la télophase et surtout durant la cytokinèse, elle apparaît au niveau du midbody où elle sera dégradée en sortie de mitose par l'APC/^{Cdh1} (Bischoff et al., 1998 ; Bischoff and Plowman, 1999 ; Vader and Lens, 2008) (Figure 29).

Des analyses de récupération de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ont permis de montrer qu'il existe un équilibre dans la distribution

subcellulaire de la kinase Aurora-A ayant un tag GFP. En effet, après un court photoblanchiment, la kinase Aurora-A réapparaît très rapidement ($t_{1/2}=3s$) aux centrosomes, puis au fuseau mitotique. Ces mêmes auteurs indiquent qu'il y a un échange dynamique dans et hors du centrosome ainsi qu'au niveau du fuseau mitotique (Stenoien et al., 2003).

Le domaine régulateur (N-terminal) de la kinase Aurora-A participe à sa localisation subcellulaire (Giet and Prigent, 2001 ; Berdnik and Knoblich, 2002 ; Katayama et Al., 2003). D'après Giet and Prigent (1998 puis 2001) et Katayama et al. (2003), la localisation de la kinase Aurora-A ne dépend pas de son activité catalytique. En particulier, ce sont les A-box de la séquence du domaine régulateur de la kinase Aurora-A qui régulerait sa localisation et ses fonctions au cours du cycle cellulaire (Katayama et Al., 2003). Le domaine régulateur détermine également la spécificité de la liaison de la kinase Aurora-A à ses substrats, tout comme d'ailleurs la kinase Aurora-B, (Giet and Prigent, 1999 ; Carmena and Earnshaw, 2003).

La large distribution subcellulaire de la kinase Aurora-A montre bien le rôle clé qu'elle joue au cours du cycle cellulaire. En effet, la localisation très dynamique de la kinase Aurora-A est intimement liée à ses fonctions pendant la division cellulaire. Cependant, pour bien jouer son rôle de protéine régulatrice clé du cycle cellulaire, la kinase Aurora-A interagit avec plusieurs autres protéines de type kinases et kinésines. C'est cette interaction avec ses différents partenaires qui permet de réguler l'activité de la kinase Aurora-A tout au long du cycle cellulaire.

4. Fonctions

Plusieurs fonctions de la kinase Aurora-A ont été identifiées et étudiées en détail. La quasi-totalité de ces études montre que ces fonctions sont dévolues aux premières phases de la mitose.

4.1. Entrée en mitose

L'entrée en mitose requiert un niveau élevé de la kinase cycline-dépendante CDK1/cycline B. Ainsi, la kinase Aurora-A est nécessaire pour le recrutement et l'activation de CDK1-cycline B au centrosome (Hirota et al., 2003). Ceci participe à l'entrée en mitose des cellules. Ce processus requiert la phosphorylation de la phosphatase CDC25B sur sa sérine 353 par la kinase Aurora-A au centrosome (Dutertre et al., 2004).

Une fois phosphorylée par la kinase Aurora-A sur sa sérine 353, la phosphatase CDC25B s'accumule aux centrosomes. Cette accumulation permet de relocaliser la cycline B1 au noyau et d'activer de CDK1 à l'entrée en mitose (Cazales et al., 2005). En effet, la micro-injection d'anticorps anti-phospho S353 induit un délai mitotique tandis que la surexpression d'un mutant phosphomimétique S353 renforce les effets mitotiques induits par la phosphatase CDC25B (Dutertre et al., 2004). L'expression ectopique de la kinase Aurora-A provoque un contournement du point de contrôle de G2/M (checkpoint de dommage à l'ADN). L'extinction du point de contrôle de G2/M par l'inhibiteur UCN-01 de la kinase CHK1 conduit à l'activation de la kinase Aurora-A ainsi que la phosphorylation de CDC25B sur sa sérine 353 (Cazales et al., 2005). De même, la déplétion de Ajuba empêche l'activation de la kinase Aurora-A aux centrosomes et bloque ainsi l'entrée en mitose (Hirota et al., 2003).

Egalement, la kinase PLK1 est phosphorylée et activée sur sa thréonine 210 par la kinase Aurora-A peu de temps avant l'entrée en mitose. Cette activation s'effectue par l'intermédiaire de la protéine Bora. De plus, elle est indispensable pour que PLK1 induise l'entrée en mitose après un arrêt de la progression du cycle induit par l'activation du point de contrôle de G2/M (Macurek et al, 2008 ; Seki et al., 2008). Ces auteurs suggèrent que la fonction initiale de la kinase Aurora-A est l'activation PLK1 à la transition G2/M. Marumoto et al. (2002) ont montré que la micro-injection d'anticorps anti-Aurora-A dans des cellules HeLa à la transition G2/M induit un délai important dans l'entrée en mitose. De plus, l'activité de la kinase Aurora-A est inhibée au cours de l'activation du point de contrôle des dommages à l'ADN en G2. Dans ces conditions la surexpression de Aurora-A active induit un bypass du checkpoint provoquant l'entrée en mitose en présence de cassures dans l'ADN. Favorisant l'instabilité chromosomique qui entraînerait le développement et la progression des tumeurs malignes

4.2. Maturation et séparation des centrosomes

La maturation des centrosomes consiste au recrutement de plusieurs protéines du PCM (matériel péricentriolaire), en particulier les γ -TuRCs. Ceci permet d'améliorer la capacité de nucléation des microtubules en fin G2 (Meraldi and Nigg, 2002 ; Fu et al., 2003). Cette maturation nécessite le recrutement, la phosphorylation et l'activation par la kinase Aurora-A de certaines protéines centrosomales. Chez *C. elegans*, la kinase Aurora-A est requise pour la maturation des centrosomes. En effet, la déplétion de la kinase Aurora-A par ARN interférence dans les embryons de *C. elegans* réduit à 40% l'intensité de fluorescence de α -Tubuline. Ainsi, la kinase Aurora-A est requise pour augmenter le niveau de α -Tubuline et de deux autres

composants du PCM (ZYG-9 et CeGrip) (Hanak et al., 2001). De même, chez la drosophile, la kinase Aurora-A est requise pour la maturation des centrosomes en recrutant la centrosomine qui augmente la nucléation des microtubules en se liant à la γ -Tubuline (Berdnik and Knoblich, 2002 ; Terada et al., 2003). En outre, la kinase Aurora-A phosphoryle d'autres protéines centrosomales qui participent à la maturation des centrosomes (Lats2, NDEL1, TACC, Pak1, Cdk11) en augmentant le niveau de la γ -Tubuline (Vader and Lens, 2008 ; Carmena et al., 2009).

En tout début de prophase, les centrosomes se séparent et migrent autour du noyau pour se positionner aux deux futurs pôles du fuseau mitotique. La kinase Aurora-A est requise également pour la séparation des centrosomes. La déplétion ou l'inhibition de la kinase Aurora-A provoquent la formation de fuseaux monopolaires chez la drosophile (Glover et al., 1995), chez *C. elegans* (Hanak et al., 2001) ou chez le xénope (Roghi et al., 1998 ; Liu and Ruderman, 2008). Des expériences de déplétion par ARN interférence ou d'inhibition de la kinase par micro-injection d'anticorps anti-Aurora-A dans des cellules HeLa bloquent la séparation des centrosomes (Marumoto et al., 2003). La kinase Aurora-A phosphoryle la kinésine XIEg5 chez le xénope. Cette phosphorylation est requise pour la séparation des centrosomes (Giet et al., 1999).

4.3. Mise en place et stabilité du fuseau bipolaire

La kinase Aurora-A est requise pour la mise en place et la stabilisation du fuseau bipolaire. L'expression d'un dominant négatif de la kinase Aurora-A chez le xénope promeut la formation de fuseaux monopolaires (Roghi et al., 1998 ; Giet et al., 1999). La déplétion par ARN interférence ou l'injection d'anticorps anti-Aurora-A empêchent la formation du fuseau bipolaire (Marumoto et al., 2003).

Les microtubules astraux sont nécessaires à la formation d'un fuseau bipolaire. Ils se fixent à la paroi cellulaire, permettant ainsi de stabiliser le fuseau. Cependant, l'inhibition de la kinase Aurora-A dans des embryons ou cellules de drosophiles réduit la taille des microtubules astraux (Giet et al., 2002). Les résultats de ces auteurs montrent que la kinase Aurora-A recrute et phosphoryle D-TACC aux centrosomes. En outre, la kinase Aurora-A phosphorylerait TACC3 sur ces sérines (Ser33, Ser620, and Ser626) chez le xénope, et Ser34, Ser552 et Ser558 humaines (Cheeseman et al., 2002 ; Pascreau et al., 2005 ; Kinoshita et al., 2005). La phosphorylation de TACC par Aurora-A permettrait à TACC de s'associer à la protéine associée aux microtubules MSPS/XMAP215 pour réguler l'organisation des microtubules astraux (Lee et al., 2001 ; Giet et al., 2002). Des résultats similaires ont été obtenus chez le xénope avec TACC3/Maskin (équivalent D-TACC) (Lee et al., 2001 ; Barros et al., 2005 ; Kinoshita et al., 2005). En outre, le complexe MPS/XMAP215/ch-TOG stabilise les microtubules en s'opposant à leur dépolymérisation par la kinésine 13, MCAK (Kinoshita et al., 2005).

Plusieurs protéines interagissent avec la kinase Aurora-A et participent à la formation du fuseau mitotique. Par exemple, TPX2 se lie et active la kinase Aurora-A sur le fuseau mitotique (Kufer et al., 2002, Tsai et al., 2005). Cette activation est requise pour la formation du fuseau. Elle est régulée par la Ran-GTPase (Ran) (Figure 26), et ce, en présence ou non de centrosomes (Tsai and Zheng, 2005). La kinésine motrice Eg5 forme un tétramère qui maintient les microtubules anti-parallèles (Giet et al., 1999). Cependant, il n'a pas été prouvé, à ce jour, que cette interaction est requise pour la formation et la stabilité du fuseau. En fait, on ne connaît pas le rôle de la phosphorylation de Eg5 par Aurora-A sur le fuseau. La phosphorylation de la protéine ASAP sur sa sérine 625 est requise pour la formation

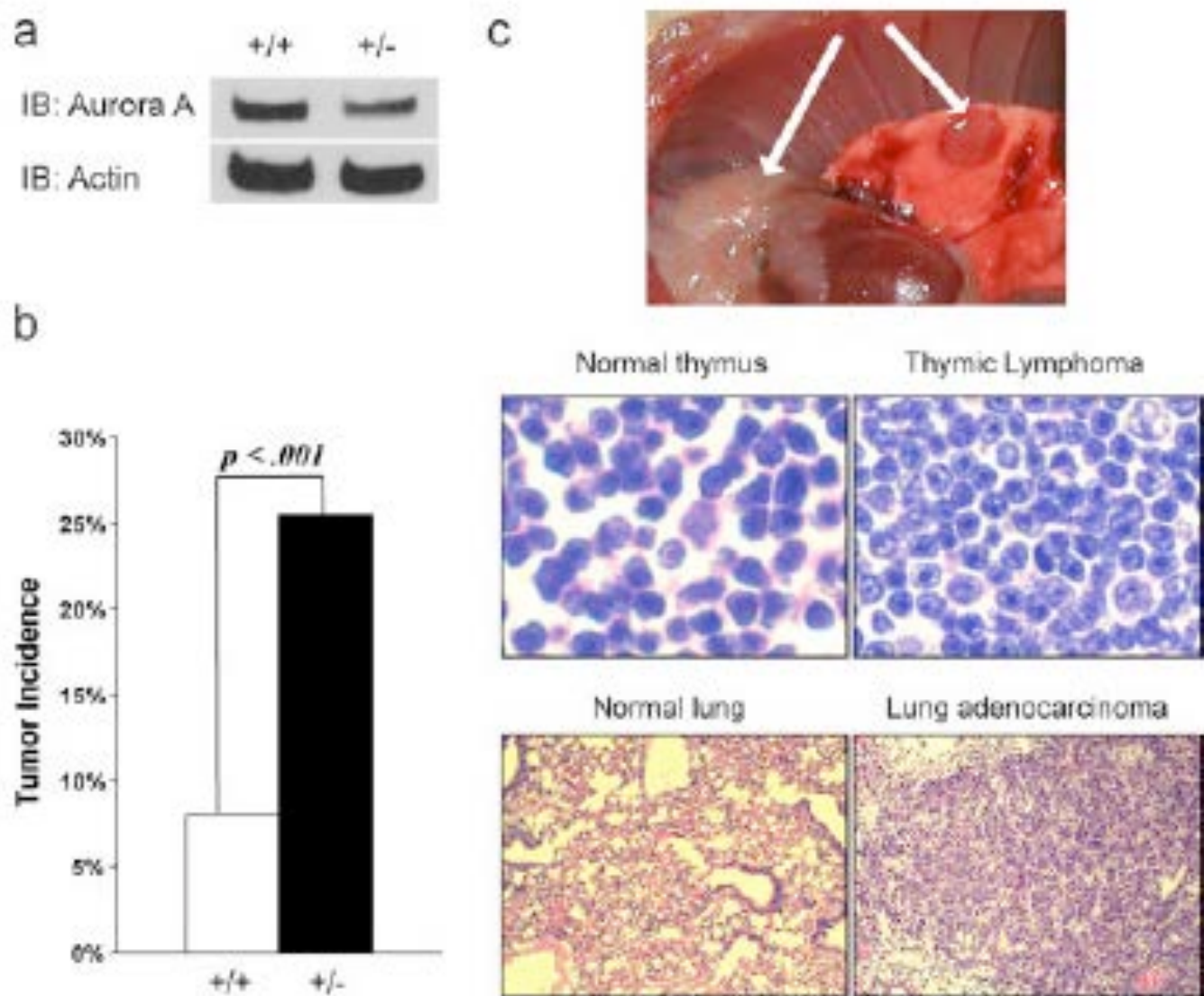


Figure 30: développement des tumeurs chez les souris hétérozygotes (Lu et al., 2008).

a) Blots montrant le niveau de la protéine Aurora-A chez les souris $Aurora-A^{+/+}$ et $Aurora-A^{+/-}$. b) Incidence des tumeurs chez les souris $Aurora-A^{+/+}$ et $Aurora-A^{+/-}$. c) Images montrant un adénocarcinome du poumon (flèche à droite) et un lymphome dans le thymus (flèche à gauche) d'une souris $Aurora-A^{+/-}$. En dessous, les coupes colorées des tissus normaux et de ceux atteints de tumeurs (Thymus et poumons).

du fuseau mitotique (Venoux et al., 2007). Enfin, la protéine HURP est impliquée dans la croissance, la stabilité et le fonctionnement du fuseau mitotique (Koffa et al., 2006).

4.4. Autres fonctions de la kinase Aurora-A

La kinase Aurora-A agit comme un suppresseur de tumeur chez la drosophile au cours de la division asymétrique des neuroblastes. En effet, L'expression d'un dominant négatif de Aurora-A induit la prolifération des neuroblastes et l'apparition de tumeurs au cerveau (Lee et al., 2006 ; Wang et al., 2006).

De même, Lu et al. (2008) ont indiqué que la kinase Aurora-A serait indispensable au cours du développement chez les embryons de souris. En effet, les mutants KO pour le gène de Aurora-A meurent très tôt au cours du développement embryonnaire, avant le stade 16 cellules. En outre, cette équipe a observé que les souris hétérozygotes Aurora-A^{+/-} développaient considérablement des tumeurs (Figure 30).

Quelques rares études ont indiqué que Aurora-A jouerait un rôle dans les phases tardives de la mitose. Marumoto et al. (2003) ont observé un défaut de cytokinèse dans des cellules HeLa après inhibition de Aurora-A par injection d'anticorps en métaphase. Ensuite, Hégarat et al. (2011) ont montré que les kinases Aurora-A et -B s'associaient pour réguler la ségrégation des chromosomes et l'organisation du fuseau central en anaphase. Enfin, Reboutier et al. (2013) ont montré que l'organisation du fuseau central en anaphase B nécessiterait la phosphorylation de la sérine 19 de P150Glued. Cette équipe a, en outre, indiqué que cette phosphorylation serait requise pour la cytokinèse.

L'activité de la kinase Aurora-A est également requise durant la méiose. En effet, Pascreau et al. (2008) ont montré que la phosphorylation de la sérine 349 de Aurora-A est nécessaire pour la transition entre la méiose I et la méiose II durant la maturation ovocytaire. De plus, Aurora-A phosphoryle la protéine Maskin durant la méiose. Cette phosphorylation aurait pour but d'empêcher la production de protéines de la méiose II pendant la méiose I (Pascreau et al., 2005).

Chapitre 4 : Résultats

Objectif de la thèse

L'étude du rôle des protéines kinases de la famille « Aurora » dans la régulation du cycle cellulaire a intéressé le Dr Claude Prigent depuis plus d'une décennie. Ainsi, son équipe de recherche « Cycle Cellulaire » a participé activement à la connaissance de cette famille de kinase, et ce dès après la découverte de la première protéine kinase « Aurora » chez la drosophile par l'équipe de Glover (Glover et al., 1995). Plus particulièrement, la kinase Aurora-A a fait l'objet de nombreuses publications de la part de cette équipe (Giet and Prigent, 1998 ; Giet and Prigent, 1999 ; Giet et al., 1999a ; Giet et al., 1999b ; Giet and Prigent, 2000 ; Giet and Prigent, 2001 ; Giet et al., 2002 ; Prigent and Giet, 2003). Cependant, ces résultats très intéressants, tout comme ceux d'autres équipes qui s'intéressaient à l'étude de la kinase Aurora-A ont porté sur le rôle de cette kinase dans les premières phases de la mitose.

Force est de reconnaître que les méthodes d'étude de la kinase au cours du cycle cellulaire jusque-là disponibles ne permettaient pas d'explorer ces fonctions dans les phases tardives de la mitose. En fait, l'inhibition de la kinase Aurora-A empêche la formation du fuseau bipolaire avec comme conséquence l'impossibilité d'investiguer au-delà de cette étape et des autres étapes ultimes de la mitose (transition métaphase/anaphase et cytokinèse). C'est ainsi que, pour contrecarrer cette insuffisance, le Dr Claude Prigent a mis en place le projet Aurora-A Shokat en collaboration avec le Dr Kevan Shokat de l'université de Californie. Cette collaboration a donc permis de mettre au point une approche de « Génétique

chimique » permettant d'étudier, *in vivo*, le rôle de la kinase Aurora-A dans les dernières phases de la mitose. Cette approche consiste à muter une kinase (AS, allele sensitive) de façon à la rendre sensible à un inhibiteur spécifique, qui n'a pas d'autres cibles dans la cellule. Cet inhibiteur (1-Na-PP1) inhibe très rapidement, et spécifiquement la kinase Aurora-A (AS) à des moments très précis du cycle cellulaire. Avant mon arrivée au laboratoire, le Dr Claude Prigent et son équipe avaient établi des constructions de lignées cellulaires stables exprimant la kinase mutée Aurora-A (AS) sous la dépendance d'un promoteur endogène ayant un tag GFP.

Ainsi, mon projet de thèse a été d'étudier, en utilisant le couple kinase Aurora-A (AS) et son inhibiteur spécifique, les rôles potentiels de la kinase Aurora-A dans les phases tardives de la prométaphase, et de poser la question d'une implication de Aurora-A dans le SAC (Spindle aseembly Checkpoint). Pour ce faire, j'ai mis en place un protocole d'inhibition de la kinase Aurora-A (AS) en fin de prométaphase, après la mise en place du fuseau bipolaire, juste avant la transition prométaphase/métaphase. En inhibant la kinase Aurora-A (AS) à ce stade de la mitose, j'ai pu mettre en évidence un rôle original de la kinase Aurora-A dans la stabilité du fuseau bipolaire en lien avec le maintien du point de contrôle de la mitose SAC, actif. En effet, le SAC est un mécanisme de contrôle cellulaire qui est actif dès le début de la mitose, après la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD) jusqu'en métaphase. Son rôle principal est d'arrêter la progression de la mitose en empêchant la transition métaphase/anaphase pour permettre aux cellules d'aligner correctement leurs chromosomes sur la plaque équatoriale (ou plaque métaphasique) afin de réaliser une ségrégation équitable des chromatides sœurs en anaphase.

Ensuite, je me suis intéressé à la caractérisation de ce rôle en recherchant les protéines du SAC qui seraient affectées par l'inhibition de l'activité kinase de Aurora-A. C'est ainsi que j'ai trouvé que la localisation des effecteurs terminaux du SAC (Mad2 et BubR1) était perturbée sous l'inhibition de la kinase Aurora-A. Les protéines Mad2 et BubR1 se localisent au niveau des kinétochores non attachés aux microtubules. Elles émettent un signal d'arrêt en inhibant la Cdc20 et empêchent ainsi l'activation de l'APC/C qui déclenche le passage en anaphase. Ces deux protéines ne sont pas des partenaires connus de la kinase Aurora-A.

Ces résultats originaux m'ont conduit en dernier ressort à chercher à identifier quel serait le partenaire de la kinase Aurora-A qui serait requis pour la localisation correcte de Mad2 et BubR1 aux kinétochores ? Pour tenter de répondre à cette question, j'ai utilisé l'approche candidat. Le laboratoire d'Ed Salmon (Howel et al., 2001) a montré que P150glued, la protéine motrice du complexe Dynéine/Dynactine était impliquée dans l'inactivation du SAC en délocalisant les protéines du SAC aux kinétochores en particulier Mad2. La Dynéine et la Dynactine sont des kinésines motrices du fuseau mitotique. Dans notre laboratoire, Romé et al. (2010) ont montré que P150glued est un substrat mitotique de la kinase Aurora-A. Ensuite, Reboutier et al. (2013) ont identifié le site phosphorylé de P150Glued humaine (sérine 19) par la kinase Aurora-A. Cette phosphorylation est requise pour la réalisation de l'anaphase B. Par conséquent, j'ai choisi de tester P150glued en utilisant un mutant (S19D) qui mime constitutivement sa phosphorylation et un mutant non phosphorylable (S19A) dans une expérience pour sauver le phénotype de Mad2 aux kinétochores. Cette expérience de sauvetage du phénotype n'a pas réussi, bien qu'elle ait montré que la phosphorylation du résidu S19 de P150glued est requise pour maintenir le SAC actif en prométaphase. Ceci suggère que le rôle de la kinase Aurora-A sur le maintien

d'un SAC actif passe par d'autres protéines en plus de P150glued qui restent à déterminer.

Article

Aurora-A kinase activity is required to maintain the spindle assembly checkpoint active during prometaphase.

Alghassimou DIALLO^{1,2,3}, David REBOUTIER^{1,2}, Erwan WATRIN^{1,2}, and
Claude PRIGENT^{1,2*}

L'activité kinase de Aurora-A est requise pour maintenir le point de contrôle du fuseau bipolaire actif durant la prométaphase.

Introduction

La kinase Aurora-A appartient à la famille des sérines/thréonines kinases Aurora (A, B et C). Elles sont relativement bien conservées au cours de l'évolution. Et, Aurora-A et B sont des kinases clés dans le contrôle de la mitose (Adams et al., 2001a ; Giet and Prigent, 1999 ; Nigg, 2001 ; Prigent and Giet, 2000). Pour réguler le cycle cellulaire, la kinase Aurora-A adopte une localisation très dynamique quoique sa zone de prédilection reste les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique ; d'où son appellation de « Aurora polaire ». Les fonctions de la kinase Aurora-A sont étroitement liées à sa dynamique localisation durant la mitose.

Par ailleurs, portée par le chromosome 20q13, la kinase Aurora-A se comporte à la fois comme oncogène et suppresseur de tumeurs (Bischoff et al., 1998 ; Lee et al., 2006 ; Sen et al., 1997 ; Tanaka et al., 1999 ; Wang et al., 2006 ; Zhou et al., 1998). Eu égard à ces deux fonctions essentielles, la kinase Aurora-A constitue une cible de premier plan pour la recherche de traitements anticancéreux. Dans ce cadre, plusieurs molécules chimiques ont été testées. Cependant, compte tenu de la nature conservée entre les trois kinases « Aurora », toutes ces molécules ont la particularité de les inhiber plus ou moins efficacement (Dar et al., 2010).

Pour s'affranchir de cette contrainte, nous avons utilisé l'approche génétique chimique. Il s'agit de muter une kinase pour la rendre sensible à un inhibiteur spécifique qui n'a pas d'autres cibles dans la cellule. Cette technique nous permet d'inhiber très rapidement, de manière très spécifique, la kinase Aurora-A (AS) à un moment précis au cours de la mitose. Ceci dans le but d'étudier d'éventuels rôles de la kinase Aurora-A dans les dernières phases de la mitose. En effet, l'inhibiteur de la kinase Aurora-A (AS), le 1-Na-PP1, est un orthologue de l'ATP. Il empêche la kinase

Aurora-A (AS) de capter le phosphore nécessaire à sa phosphorylation au niveau de sa boucle d'activation.

Résumé

Le point de contrôle du fuseau (SAC, spindle Assembly chackpoint) est un mécanisme de surveillance mitotique qui doit être satisfait pour que la cellule déclenche la transition métaphase/anaphase. Pour le satisfaire, chaque chromosome doit être bi-orienté avec chaque kinétochore attaché aux microtubules émanant du pôle du fuseau opposé. Ici nous avons démontré que Aurora-A, le membre "polaire" de la famille des kinases Aurora, est requise pour maintenir le SAC actif durant la prométaphase. Nous avons profité de l'avantage qu'offre l'approche génétique chimique pour inhiber spécifiquement l'activité kinase de Aurora-A dans les phases tardives de la prométaphase. Nous avons d'abord remarqué que l'inhibition de Aurora-A conduit à un défaut congression des chromosomes. Paradoxalement, l'index mitotique chute presque de moitié, indiquant une sortie prématurée de la mitose. Durant le traitement au nocodazole ou au taxol qui maintiennent la cellule en prométaphase en inhibant l'assemblage du fuseau et en maintenant le point de contrôle actif, l'inhibition de l'activité de la kinase Aurora-A provoque une sortie rapide de la mitose. Ceci est dû à un contournement du point de contrôle, puisque la localisation aux kinétochores de Mad2 et BubR1 a été perturbée. Nos résultats suggèrent que l'activité de la kinase Aurora-A est requise pour maintenir le point de contrôle actif durant la prométaphase. La kinase Aurora-A phosphoryle p150Glued pour empêcher le complexe dynéine/dynactine d'enlever les protéines du SAC aux kinétochores. En effet, l'expression du mutant S19A non-phosphorylable de

p150Glued montre le même phénotype que l'inhibition de la kinase Aurora-A. Cependant p150Glued n'est pas le seul substrat de la kinase Aurora-A requis pour maintenir le point de contrôle actif, puisque l'expression du mutant S19D mimant la phosphorylation constitutive de p150Glued ne sauve pas le phénotype Mad2 aux kinétochores après l'inhibition de la kinase Aurora-A.

Aurora-A kinase activity is required to maintain the spindle assembly checkpoint active during prometaphase.

Running title : Aurora-A controls SAC activity

Alghassimou DIALLO^{1,2,3}, David REBOUTIER^{1,2}, Erwan WATRIN^{1,2}, and Claude PRIGENT^{1,2*}

1 - CNRS, Unité Mixte de Recherche UMR6290, 35043 Rennes, France

2 - Université de Rennes 1, Institut de Génétique et Développement de Rennes, UEB, 35000 Rennes, France

3 – Institut Supérieur Agronomique et Vétérinaire (VGE) de Faranah, Guinée

*Correspondence to Claude Prigent: claud.prigent@univ-rennes1.fr

Institut de Génétique et Développement de Rennes, IGDR, CNRS UMR6290 Université de Rennes 1, 2 avenue du Pr Leon Bernard, 35043 Rennes cedex.

4 figures, 2 supplementary figures, 2 movies, 5369 words,

Summary

The spindle assembly checkpoint (SAC) is a mitotic surveillance mechanism that must be satisfied to allow the cell to progress from metaphase to anaphase. To do so, each chromosome must be bi-oriented with each kinetochore of a pair attached to microtubules emanating from opposite spindle pole. We took advantage of a chemical genetic approach to specifically inhibit Aurora-A kinase activity in late prometaphase to ask whether Aurora-A activity was required for the SAC function. We found that inhibition of Aurora-A leads to chromosome congression defect and that the mitotic index falls about a half indicating a premature exit from mitosis. During nocodazole or paclitaxel treatment, that should maintain the SAC active, inhibition of Aurora-A activity provokes a rapid exit from mitosis by inactivating the SAC since kinetochores localization of Mad2 and BubR1 was disrupted. Thus Aurora-A kinase activity is required to maintain the SAC active by maintaining the localisation of Mad2 and BubR1 at unattached kinetochore. Aurora-A fulfils this function, at least partially, by phosphorylating the dynactin subunit p150Glued at serine 19.

Introduction

Aurora kinases are key regulators of mitosis that fulfil complementary functions, illustrated by their respective localisation on mitotic structures: Aurora-A at the centrosome and spindle poles while Aurora-B and Aurora-C on chromosomes and the midbody ([Giet et al., 2005](#)).

Aurora-B and Aurora-C belong to the chromosome passenger complex (CPC) ([for review Carmena et al., 2012b](#)). Their kinase activities are required for chromosome condensation by phosphorylating histones ([Hsu et al., 2000](#)), for the spindle assembly checkpoint (SAC) by phosphorylating and regulating MCAK ([Andrews et al., 2004](#)), for cytokinesis by phosphorylating centralspindlin component ([Guse et al., 2005](#)) and for abscission checkpoint ([Norden et al., 2006](#)). Aurora-A is involved in G2/M transition ([Dutertre et al., 2004](#))([Seki et al., 2008](#)), centrosome maturation ([Hannak et al., 2001](#)) and spindle assembly during prometaphase ([Roghi et al., 1998](#)).

The SAC is a surveillance mechanism that monitors attachment of kinetochores to microtubules during the process of bipolar spindle assembly ([Rieder and Maiato, 2004](#)). Every mitotic chromosome made of two sister chromatids possesses one kinetochore per chromatid. In metaphase, every chromosome kinetochore must have been captured by microtubules emanating from the spindle pole. Once all kinetochores are attached to microtubules coming from opposite spindle poles, the SAC is switched off allowing the cell to enter anaphase and chromosome segregation to proceed ([Foley and Kapoor, 2013](#)).

At the molecular level the SAC is maintaining the inhibition of an ubiquitin ligase complex called Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) through the presence of the protein Mad2 that binds to APC/C activator Cdc20 ([Nilsson et al., 2008](#)). Mad2 localises at kinetochores when unattached to microtubules, and is released from kinetochores upon kinetochore capture by microtubules ([Chen et al., 1996](#)). One single unattached kinetochore containing Mad2 is sufficient to inhibit metaphase to anaphase transition. Once all

kinetochores are attached to microtubules, the inhibition of Mad2 is relieved; Cdc20 binds to and activates the APC/C, which in turn ubiquitinates the securin allowing its degradation by the proteasome. Without securin, the separase becomes active and cleaves the cohesin subunit Scc1/Rad21/Mcd1 triggering sister chromatid separation ([Uhlmann et al., 1999](#)). APC/C also targets Cyclin B1 to degradation, which induces inhibition of CDK1 activity allowing cells' exit from mitosis ([Thornton and Toczyski, 2003](#)).

BubR1, like Mad2, is present on unattached kinetochores and participates with Mad2 in the SAC activity ([Fang, 2002](#)). BubR1 protein sequence shows signatures of a protein kinase, however its catalytic activity is not required for its role in the spindle assembly checkpoint ([Suijkerbuijk et al., 2012](#)).

Although regulation of the SAC has been devoted to Aurora-B rather to Aurora-A, there are data suggesting that the Aurora-A might also be involved in SAC regulation. For instance, phosphorylation of the centromere histone H3 variant CENP-A on serine 7 by Aurora-A is required to localise Aurora-B at the kinetochore ([Kunitoku et al., 2003](#)). CENP-A Serine 7 is also phosphorylated by Aurora-B. CENP-A is considered as the platform to build the kinetochore where the SAC is assembled. Furthermore, we and others have reported that overexpression of Aurora-A led to premature exit from mitosis of cells treated with paclitaxel ([Anand et al., 2003](#)) ([Dutertre and Prigent, 2003](#)).

Inhibition of Aurora-A kinase in cells leads to defects in spindle assembly, which hinders any study of the kinase role in regulating the SAC ([Hoar et al., 2007](#)). To overcome this problem we have set up a chemical genetic approach that allows inhibition of Aurora-A in a timely precise manner. We have previously shown by using this approach that the kinase activity of Aurora-A is required for anaphase B by phosphorylating the dynactin subunit p150Glued ([Reboutier et al., 2013](#)).

Here we report that in the absence of Aurora-A activity cells exhibit chromosome congression

defect, premature entry in anaphase, and delocalisation of Mad2 and BubR1 from kinetochores, demonstrating for the first time that Aurora-A activity is required to maintain the SAC active during prometaphase. Finally we identified p150Glued as one of the key Aurora-A substrates which phosphorylation by Aurora-A is required but not sufficient to keep the SAC active.

Results

Inhibition of Aurora A in late prometaphase induces congression defect and shortens mitosis

We engineered an allele sensitive Aurora-A (as-Aurora-A), which activity can be inhibited by an ATP analogue (Reboutier et al., 2013). This chemical genetic approach allows specific inhibition of Aurora-A in a very narrow window of time during cell cycle progression. We took advantage of this system to test whether Aurora-A activity had any role in the SAC. We used one cell line expressing a wild type version of Aurora-A (wt-Aurora-A) and one cell line expressing an as-Aurora-A version. Both Aurora-A version were tagged with GFP. Only as-Aurora-A is sensitive to the ATP analogue 1-Na-PP1 (Reboutier et al., 2013). Importantly the ectopic kinase was expressed under the control of its own minimum promoter (Tanaka et al., 2002) (Reboutier et al., 2013). We depleted the endogenous Aurora-A by RNA interference, controlled the efficiency of the depletion (figure 1B) and left the cells with the ectopic Aurora-A. The cells were treated with the RO-3306 CDK1 inhibitor at a concentration of 2 mM for 5 hours to synchronize them at the G2/M transition (Vassilev et al., 2006). The cells were then released from the drug inhibition by successive washes and treated in late prometaphase with 10 μ M 1-Na-PP1 for 30 min, fixed and proceed for immunofluorescence microscopy (Figure 1A). During the analysis, we first observed that upon inhibition of Aurora-A the chromosomes were not properly aligned and/or condensed on the metaphase plate. The metaphase plate appeared shorter and thicker suggesting a congression defect (Figure 1C). In order to quantify these defects, we calculated a congression index (CI) defined as the ratio between the width (W) and height (H) of the equatorial plate (W/H) (Green and Kaplan, 2003) (Figure 1C).

In the presence of 1-Na-PP1, in control cells that do not express any ectopic kinase the CI

was 0.46 ± 0.09 , like in cells expressing wt-Aurora-A in which CI was 0.48 ± 0.12 . In cells expressing the as-Aurora-A however the CI was higher and reached 0.66 ± 0.13 (Figure 1D). This suggests that proper alignment of chromosomes on the metaphase plate depends on Aurora-A kinase activity. If true, it should also imply that the mitotic index would increase upon Aurora-A inhibition indicating an increase in mitosis duration to give time to cells to correct the defects (Khodjakov and Rieder, 2009).

To test this prediction we determined the mitotic index for each condition by counting the number of cells stained with an antibody directed against the phosphorylated serine 10 of histone H3 compared with total cells staining with DAPI (Figure 1E). The percentages calculated for each cell line are shown in Figure 1F. The mitotic index (expressed in percentage of cells) of the control cell line was $15.6\% \pm 4.3$, comparable to the mitotic index of the cell line expressing the wt-Aurora-A: $15.5\% \pm 3.9$. The mitotic index of the cell line expressing the as-Aurora-A however was twice smaller $8.6\% \pm 2.2$. The same data was obtained by directly counting mitotic cells using only DAPI staining (Figure S1A and B).

These data were in contradiction with our prediction: despite chromosome misalignment, the cells did not delay mitosis, but instead they prematurely exited mitosis. This strongly suggested that the SAC was defective upon Aurora-A inhibition and led us to investigate the involvement of Aurora-A in regulating the SAC.

Inhibition of Aurora-A induces SAC extinction

To directly test a function of the Aurora-A kinase in the SAC, we treated the three cell lines with two different microtubule poisons: nocodazole and paclitaxel (Jordan et al., 1992) (De Brabander et al., 1981). These compounds affect microtubule dynamics and arrest the cells in mitosis for several hours by maintaining the SAC active (Rieder and Maiato 2004).

Cells from the three cell lines were blocked in mitosis and treated with the ATP analog 1-Na-PP1 to inhibit as-Aurora-A as described in figure 1. We then measured the time spent in mitosis by each cell line in these conditions.

We first counted the number of cells in mitosis when treated with the microtubule poisons in the presence of 1-Na-PP1. The number of mitotic cells was much higher when expressing wt-Aurora-A than when expressing as-Aurora-A: 2.5 times higher in the presence of nocodazole (Figure 2D) and 4 times higher in the presence of paclitaxel (Figure S2).

Using live cell imaging we observed that in the presence microtubule poison and 1-Na-PP1, most control cells and cells expressing wt-Aurora-A remain in mitosis for several hours as expected (3 hours in figure 2C and supplementary figure S3A). Only cells expressing as-Aurora-A exit from mitosis in less than one hour meaning that inhibition of Aurora-A induces mitosis exit (figure 2C and supplementary figure S3B). Quantification shows that only $27.8\% \pm 6.0$ of the cells expressing active wt-Aurora-A escape the nocodazole block within one hour while upon inhibition of Aurora-A the percentage of cells escaping the block reaches $74.7\% \pm 2.8$ (figure 3D). Similar observations were made when cells were treated with paclitaxel, $16.7\% \pm 3.8$ of cell containing active Aurora-A escape mitosis whereas $69.1\% \pm 3.3$ escape mitosis in the absence of active Aurora-A (figure S2). Additionally, mitosis exit is accompanied by cytokinesis defects that eventually lead to the formation of multinucleated cells. These data demonstrate that Aurora-A kinase activity is required to maintain the SAC active during prometaphase.

Inactivation of Aurora-A disrupts the localization Mad2 and BubR1

To obtain molecular insight into the role of Aurora-A in maintaining the SAC active we investigated the behaviour of two of its components Mad2 and BubR1 under inhibition of

Aurora-A activity. We followed the experimental approach previously described (figure 1A). We evaluated the localization of both Mad2 and BubR1 in late prometaphase in the presence or in the absence of Aurora-A activity (figure 3A and 3D).

In control cells without any treatment 87% of cells show Mad2 at the kinetochores in prometaphase. In the presence of 1-Na-PP1, 90% of cells expressing wt-Aurora-A also show Mad2 at the kinetochores whereas only 10% of cells expressing as-Aurora-A do (figure 3B). We observed that Aurora-A kinase inhibition leads to a dramatic decrease of Mad2 protein at the kinetochores of chromosomes. Additionally we observed a new localization of Mad2 to the spindle poles at the centrosomes (figure 3C).

In the case of BubR1, 92% of cells that did not receive any treatment show BubR1 at the kinetochores in prometaphase. In the presence of 1-Na-PP1, 90% of cells expressing wt-Aurora-A also show BubR1 at the kinetochores while only 37% of cells expressing as-Aurora-A do. However, on the contrary to what we observed for Mad2, BubR1 does not re-localize at the centrosome (figure 3F). Inhibition of Aurora-A leads to a reduced level of BubR1 at the kinetochore (figure 3E).

Western blot analysis revealed that BubR1 and Mad2 protein levels were not affected by Aurora-A inhibition indicating that the absence of both proteins at the kinetochores is not due to protein degradation (figure 3G). Thus, the activity of the Aurora-A kinase is required for the maintenance of the two checkpoint proteins Mad2 and BubR1 at kinetochores.

Phosphorylation of P150Glued by Aurora-A participates in maintaining the SAC active in prometaphase

P150Glued is a subunit of the dynein/dynactin complex involved in silencing SAC by removing checkpoint protein from the kinetochores (Howel et al., 2001) (Famulski et al.,

2011). P150Glued has been identified as a mitotic substrate of Aurora-A that phosphorylates its Microtubule Binding Domain (MBD) (Romé et al., 2010) (Reboutier et al., 2013). Phosphorylation of p150Glued regulates its affinity to microtubules (Romé et al., 2010). We demonstrated that phosphorylation of Serine 19 in human p150Glued depends on Aurora-A and is required for anaphase B in human cells (Reboutier et al., 2013).

We decided to test whether this phosphorylation of p150Glued on S19 by Aurora-A was also involved in maintaining the checkpoint active in prometaphase. To test this hypothesis we first expressed the version of p150Glued that cannot be phosphorylated by Aurora-A and found that it induced a removal of Mad2 from the kinetochores just like inhibition of Aurora-A (figure 4A). This clearly indicates that serine 19 must be phosphorylated to maintain Mad2 localised on non-attached kinetochores in order to keep the SAC active. Expression wt-p150Glued or of a version of p150Glued that mimics constitutive phosphorylation of S19 (S19D) had no effect on Mad2 localisation at kinetochores (figure 4A). We then intended to rescue the phenotype obtained upon Aurora-A inhibition by expressing the S19D version of p150Glued. However this was not sufficient to restore the localisation of Mad2 at the kinetochores in the absence of Aurora-A activity (figure 4A and 4B). We see two possible explanations for this data: (1) the S19D does not functionally mimic phosphorylated S19 or (2) p150Glued is not the only protein that must be phosphorylated by Aurora-A to maintain both BubR1 and Mad2 at kinetochores.

Our data however clearly indicate that serine 19 of p150Glued must be phosphorylated, presumably by Aurora-A, to maintain Mad2 localised on non-attached kinetochores and to keep the SAC active.

Discussion

During cell cycle progression Aurora-A is synthesized in early G2, the maximum protein level is reached in metaphase and the protein is degraded in the following G1 ([Castro et al., 2002a and 2002b](#)). The kinase activity is required for the G2/M transition by phosphorylating and activating enzymes such as the phosphatase CDC25 and the protein kinase PLK1 ([Dutertre et al., 2004](#)) ([Seki et al., 2008](#)) ([Macûreket al., 2008](#)). The kinase is also required for centrosome maturation and bipolar spindle assembly ([Roghi et al., 1998](#)) ([Hannak et al., 2001](#)) ([Berdnik and Knoblich., 2002](#)).

All the studies describing Aurora-A functions are using loss of function by RNA interference, mutations in animal models or expression of dominant negative version of the kinase or gain of function by overexpressing wild-type Aurora-A or mutated version that become hyperactive or not degradable ([Glover et al., 1995](#)) ([Zhou et al., 1998](#)) ([Schumacher et al., 1998](#)) ([Littlepage et al., 2002](#)) ([Sasai et al., 2008](#)). In each case the phenotype observed corresponded to abnormal spindle and the cell never reaches metaphase. Aurora-A is required for centrosome maturation ([Hannak et al., 2001](#)) ([Berdnik and Knoblich, 2002](#)). During cell cycle progression centrosome maturation corresponds to the acquisition by the centrosome of a high rate microtubule nucleation capability that is achieved by recruiting proteins involved in bipolar mitotic spindle assembly. This recruitment reaches a maximum level in prometaphase and remain high until metaphase to decrease during anaphase and telophase ([Piehl et al., 2004](#)). We asked whether Aurora-A was involved in the SAC by specifically inhibiting Aurora-A activity once the centrosomes have been matured and the cell is approaching metaphase. We succeeded to do so by taking advantage of a chemical genetic approach described in [Reboutier et al., 2013](#).

Aurora-A has never been directly involved in kinetochore functions. However Aurora-A

phosphorylates CENP-A in prophase to allow Aurora-B localisation at kinetochores (Kunitoku et al., 2003). Eventually Aurora-A and Aurora-B share substrates but the phosphorylation seems to always take place at the kinase location. Aurora-A is thought to phosphorylate its substrates at centrosome while Aurora-B at the kinetochores. For instance Aurora-A phosphorylates MCAK and PLK1 at the centrosome (Zhang et al., 2008) (Seki et al., 2008) (Macûrek et al., 2008) while Aurora-B phosphorylates the same two proteins on the same residues at the kinetochore (Lan et al., 2004) (Andrews et al., 2004) (Carmena et al., 2012a). These data demonstrate that both Aurora-A and Aurora-B act in concert on same substrates but at different location to coordinate mitotic progression. Hochegger group recently showed this in a very elegant way (Hégarat et al., 2011).

Here we found that inhibition of Aurora-A in late prometaphase leads to reduced amounts of the checkpoint proteins Mad2 and BubR1 at kinetochores. Treatment of cells with microtubule poisons such as nocodazole and paclitaxel should in normal conditions maintain the SAC active with Mad2 and BubR1 at the kinetochores because attachments of kinetochore to microtubules cannot occur (Rieder and Maiato, 2004). In these conditions, we observed that inhibition of Aurora-A leads to the extinction of the checkpoint by removing Mad2 and BubR1 from kinetochores. While BubR1 was not detected anymore in the cell, Mad2 concentrated to the centrosomes. This demonstrated that Aurora-A activity is required to maintain Mad2 and BubR1 at non-attached kinetochore during prometaphase insuring that the SAC remains active.

Aurora-A phosphorylates many substrates during mitosis like p150Glued that is targeted by the kinase all along mitosis. Phosphorylation of p150Glued by Aurora-A is required in *Drosophila* for spindle assembly by regulating microtubule affinity of the protein (Romé et al., 2010). In human cell, phosphorylation of p150Glued by Aurora-A is required for central spindle assembly in anaphase (Reboutier et al., 2013). This dynactin subunit was also a good

candidate to be an Aurora-A substrate involved in maintaining the SAC because dynein/dynactin controls the transport of kinetochore components from the kinetochores to the spindle poles during SAC inactivation ([Howell et al., 2001](#)) ([Famulski et al., 2011](#)). Our hypothesis was that p150Glued phosphorylation by Aurora-A might be required to inhibit transport by dynein/dynactin from the kinetochore to the centrosome.

To test this hypothesis we first expressed in cells containing Aurora-A activity, three different versions of p150Glued: a wild-type version, a version that cannot be phosphorylated at serine 19 (S19A) and a version that mimics a constitutively phosphorylated serine 19 (S19D). Expression of S19A led to the same effect than inhibition of Aurora-A, Mad2 was removed from unattached kinetochores triggering SAC extinction. This data is important because it demonstrate that phosphorylation of this site is necessary to maintain the SAC active in late prometaphase.

We also tested whether expression a version of p150Glued that mimics a constitutively phosphorylated serine 19 (S19D) was able to rescue unattached kinetochore localisation of Mad2 in the absence of Aurora-A activity. This rescue failed suggesting that although phosphorylation of p150Glued is necessary to maintain the SAC active during prometaphase, it is not sufficient. Other proteins need to be phosphorylated by Aurora-A during prometaphase to maintain the SAC active. A search for those substrates is currently undertaken.

This is the first report that demonstrates a role of Aurora-A kinase activity in the SAC. This is an important data since Aurora-A is a major target in cancer therapy with several inhibitors currently in clinical trials ([Kollareddy et al., 2012](#)). Understanding precisely multiple functions of Auurora-A during mitosis will undoubtedly help designing drug associations to increase the efficiency of chemotherapeutic agents to eliminate cancer cells ([Schmidt et al., 2010](#)) ([Bush et al., 2013](#)).

Materiels and Methods

Cell Culture

Three U2OS cell lines were used in this study, a normal U2OS cell line as control and two stable cell lines expressing a wild-type version of Aurora-A tagged with GFP (wt-Aurora-A) and an allele sensitive version of Aurora-A tagged with GFP (as-Aurora-A). Both versions of Aurora-A were expressed under the control of Aurora-A endogenous promoter ([Reboutier et al., 2013](#)). These cell lines were maintained in McCoy's5A containing GluthaMAX (GIBCO, Invitrogen) supplemented with 10% FBS (PAA) and 1% penicillin-streptomycin (GIBCO, Invitrogen). In addition, the stable cell lines wt-Aurora-A and as-Aurora-A were grown in the presence of 1.25 mg/ml of geneticin (G418 sulphate, PAA).

Small interfering RNA

The oligonucleotide sequence of the siRNA targetting Aurora-A (QIAGEN) was 5' - AAATGCCCTGTCTTACTGTCA - 3' ([Reboutier et al., 2013](#)). Transfection was performed using the JetPRIME (Polyplus transfection) and depletion of endogenous Aurora-A kinase was controlled by western blot in every experiment as described in Reboutier et al., 2013.

Western blot

Cells were harvested by treatment with trypsin-EDTA (GIBCO, Invitrogen) and resuspended in McCoy's5A containing GluthaMAX, centrifuged at 1200 rpm at 4°C for 3 min and washed 3 times in PBS. The cell pellet was resuspended in Laemmli buffer, sonicated and incubated for 5 min at 95°C. Proteins of cell extracts were separated on 12.5% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane. After transfer the membrane was blocked with 3% non-fat milk in TBST during 1h at room temperature following by an overnight incubation in

in TBST containing 3% non-fat milk and the primary antibodies. The primary antibodies used were the mouse anti-Aurora-A 5C3 (1/100, [Cremet et al., 2003](#)); a rabbit anti-Mad2 (1/1000, Covance); a purified mouse anti-BubR1 (1/1000, BD Transduction Laboratories); a rabbit anti-HCAP-D2 (1/10000, [Collas et al., 1999](#)); a mouse anti-Cyclin B1 (1/1000, SantaCruz); a mouse anti-HA (1/1000, Covance); a mouse anti-p150^{glued} (1/1000, BD Transduction Laboratories) and a mouse anti- β -Tubulin (1/2000, Sigma-Aldrich). The secondary anti-mouse or anti-rabbit IgG coupled to peroxidase were from Jackson (1/5000 and 1/110000, Jackson Laboratories). Finally, the membranes were processed for chemiluminescence enhancement with Dura or Pico (Thermo Fisher Scientific) before film exposure.

Cell synchronization

The cells were grown on coverslips in Multiwell12. They were depleted for endogenous Aurora-A using siRNA as described ([Reboutier et al., 2012](#)). Cells were then synchronized in late G2 (G2/M transition) by treatment at 37°C for 5h with 2 μ M CDK1 inhibitor RO3306 (Calbiochem). Then, they were released in late prometaphase by washing out RO3306 three times 4 min. Finally cells were treated with 10 μ M 1-Na-PP1 to inhibit as-Aurora-A, fixed for 10 min either -20°C in 100% cold methanol or at room temperature 4% paraformaldehyde and processed for immunofluorescence microscopy.

Immunofluorescence

Cells fixed in methanol or paraformaldehyde as described above, were washed with PBST buffer (PBS containing 0.1% Triton X100) and permeabilized by incubation in MBS buffer (100 mM PIPES pH 6.8, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 0.1% Triton X100). The cells were then incubated in PBST containing 1% BSA for 1 h at room temperature followed by 1h

incubation at room temperature in PBST containing 1% BSA containing primary antibodies. We used antibodies directed against: rat anti- α -tubulin (YL1/2 1/500, Millipore), mouse anti-BubR1 (1/500, BD Transduction Laboratories), rabbit anti-Mad2 (1/500, Covance), rabbit anti-phospho-Histone H3 (H3S10, 1/1000, Euromedex) and mouse anti-p150^{glued} (1/1000, BD Transduction Laboratories). After several washes in PBST containing 1% BSA cells were incubated with secondary antibodies. We used the following secondary antibodies: Alexa Fluor 488 Donkey anti-rat IgG (1/1000); Alexa Fluor 555 Donkey anti-mouse IgG (1/1000) and Alexa Fluor 555 Goat anti-rabbit IgG (1 / 1000) from Invitrogen. Finally, samples were mounted with Vectashield-DAPI (1/1000, Vector Laboratories) for DNA staining. Images of immunostaining were taken with a Coolsnap ES (Photometrics) equipped Leica DMRXA2 microscope and image acquisition software MetaVue (Molecular Devices, Inc.). The images were deconvolved with the Metamorph software (Molecular Devices, Inc.) and edited with Adobe Photoshop CS3.

Quantification of fluorescence signals

The integrated densities of Mad2 (equatorial plates and bipolar spindle poles) and BubR1 (equatorial plate) were determined, from deconvolved images taken with the Leica DMRXA2 (63x objective), using the FIJI/ImageJ 1.46i software (NIH).

Live cell imaging

Endogenous Aurora-A was depleted from both U2OS stable cell lines expressing wt-AuroraA and as-AuroraA using siRNA as described in Reboutier et al., 2013. Cells were then incubated in 50 ng/ml nocodazole or 5 μ M paclitaxel until the end of the timelapse (16h). After 13h incubation in nocodazole, cells were treated with 10 μ M 1-Na-PP1 and filmed for 3 h. Addition of 1-Na-PP1 marks the T0 of each movie. Video microscopy was performed on

a Leica DM IRB microscope equipped with a 63x/1.4 oil-objective and with a Coolsnap HQ camera (Photometrics) driven with Metamorph software (Molecular Devices, Inc.). Images were acquired every 5 min and analysed using the same software.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed with Tukey's HSD (Honestly Significant Difference test) test using R 2.13.0 software. Values were represented as histograms or boxplot.

Acknowledgments:

Alghassimou DIALLO was a fellow of the Guinée government and David Reboutier a fellow of the ANR. We thank MRic facility (Microscopy Rennes Imaging Center, Biosit, IBISA), Stéphanie Dutertre (Biosit) and Jacques Pécreaux for helpful advice on integrated density. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Rennes 1, Institut National du Cancer, Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labelisée), and Agence Nationale de la Recherche (Aurora).

References:

Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., and Venkitaraman, A. R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*. **3**(1), 51-62.

Andrews, P. D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J. R. (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell*. **6**(2), 253-68.

Berdnik, D. and Knoblich, J. A. (2002). Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr Biol*. **12**(8), 640-7.

Bush, T. L., Payton, M., Heller, S., Chung, G., Hanestad, K., Rottman, J. B., Loberg, R., Friberg, G., Kendall, R. L., Saffran, D. and Radinsky, R. (2013). AMG 900, a Small-Molecule Inhibitor of Aurora Kinases, Potentiates the Activity of Microtubule-Targeting Agents in Human Metastatic Breast Cancer Models. *Mol Cancer Ther*. **12**(11):2356-66.

Carmena, M., Pinson, X., Platani, M., Salloum, Z., Xu Z., Clark, A., Macisaac, F., Ogawa, H., Eggert, U., Glover, D. M., Archambault, V. and Earnshaw, W. C. (2012a). The chromosomal passenger complex activates Polo kinase at centromeres. *PLoS Biol*. **10**(1):e1001250. Erratum in: PLoS Biol. 2012 Feb;10(2).

Carmena, M., Wheelock, M, Funabiki, H. and Earnshaw, W. C. (2012b). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**(12), 789-803.

Castro, A., Arlot-Bonnemains, Y., Vigneron, S., Labbé, J. C., Prigent, C. and Lorca, T. (2002a). APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep.* **3**(5), 457-62.

Castro, A., Vigneron, S., Bernis, C., Labbé, J. C., Prigent, C. and Lorca, T. (2002b). The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Rep.* **3**(12), 1209-14.

Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon E. D. and Murray A. W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMAP2 with unattached kinetochores. *Science.* **274**(5285), 242-6.

Collas, P., Le Guellec, K. and Taskén, K. (1999). The A-kinase-anchoring protein AKAP95 is a multivalent protein with a key role in chromatin condensation at mitosis. *J Cell Biol.* **147**(6), 1167-80.

Crement, J. Y., Descamps, S., Vélite, F., Martin, A. and Prigent, C. (2003). Preparation and characterization of a human aurora-A kinase monoclonal antibody. *Mol Cell Biochem.* **243**(1-2), 123-31.

De Brabander, M., Geuens, G, Nuydens, R, Willebrords, R. and De Mey, J. (1981). Taxol

induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **78**(9), 5608-612.

Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouché, J. P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C. and Ducommun, B. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci*. **117**(Pt 12), 2523-31.

Dutertre, S. and Prigent, C. (2003). Aurora-A overexpression leads to override of the microtubule-kinetochore attachment checkpoint. *Mol Interv*. **3**(3), 127-30.

Famulski, J. K., Vos, L. J., Rattner, J. B. and Chan, G. K. (2011). Dynein/Dynactin-mediated transport of kinetochore components off kinetochores and onto spindle poles induced by nordihydroguaiaretic acid. *PLoS One*. **6**(1):e16494. Erratum in: *PLoS One*. 2011;6(2).

Fang, G. (2002). Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell*. **13**(3), 755-66.

Foley, E. A. and Kapoor, T. M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **14**(1), 25-37.

Giet, R., Petretti, C. and Prigent, C. (2005). Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol*. **15**(5), 241-50.

Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A. and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*. **81**(1), 95-105.

Green, R. A. and Kaplan, K. B. (2003). Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol*, **163**(5), 949-961.

Guse, A., Mishima, M. and Glotzer M. (2005). Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol*. **15**(8), 778-86.

Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A. A. and Oegema K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*. **155**(7), 1109-16.

Hégarat, N., Smith, E., Nayak, G., Takeda, S., Eysers, P. A. and Hohegger, H. (2011). Aurora A and Aurora B jointly coordinate chromosome segregation and anaphase microtubule dynamics. *J Cell Biol*. **195**(7), 1103-13.

Hoar, K., Chakravarty, A., Rabino, C., Wysong, D., Bowman, D., Roy, N. and Ecsedy, J. A. (2007). MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. *Mol Cell Biol*. **27**(12), 4513-25.

Howell, B. J., McEwen, B. F., Canman, J. C., Hoffman, D. B., Farrar, E. M., Rieder, C. L. and Salmon E. D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell*

Biol. **155**(7), 1159-72.

Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., Lin, R., Smith, M. M. and Allis, C. D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*. **102**(3), 279-91.

Jordan, M. A., Thrower, D. and Wilson, L. (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci.* **102**(Pt 3), 401-16.

Khodjakov, A. and Rieder, C. L. (2009). The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J Biol.* **8**(10),88.

Kollareddy, M., Zheleva, D., Dzubak, P., Brahmshatriya, P. S., Lepsik, M. and Hajdich, M. (2012). Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic. *Invest New Drugs.* **30**(6), 2411-32.

Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H. and Hirota, T. (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell.* **5**(6), 853-64.

Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S. L., Rosasco, S. E., Barrett-Wilt, G. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Walczak, C. E. and Stukenberg, P. T. (2004). Aurora B phosphorylates

centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol.* **14**(4), 273-86.

Littlepage, L. E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J. K., Amundadottir, L. T. and Ruderman, J. V. (2002). Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(24), 15440-5.

Macůrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M. A., Klompmaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S. S., Yaffe, M. B., Medema, R. H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature.* **455**(7209), 119-23.

Nilsson J, Yekezare M, Minshull J, Pines J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol.* **10**(12), 1411-20.

Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C. V., Biggins, S. and Barral, Y. (2006). The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell.* **125**(1), 85-98.

Piehl, M., Tulu, U. S., Wadsworth, P. and Cassimeris, L. (2004). Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(6), 1584-8.

Reboutier, D., Troadec, M. B., Cremet, J. Y., Chauvin, L., Guen, V., Salaun, P. and Prigent, C. (2013). Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150Glued. *J Cell Biol.* **201**(1), 65-79.

Reboutier, D., Troadec, M. B., Cremet, J. Y., Fukasawa, K. and Prigent, C. (2012). Nucleophosmin/B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J Cell Biol.* **197**(1), 19-26.

Rieder, C. L. and Maiato, H. (2004). Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell.* **7**(5), 637-51.

Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Dorée, M., Philippe, M. and Prigent, C. (1998). The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci.* **111**(Pt 5), 557-72.

Romé, P., Montembault, E., Franck, N., Pascal, A., Glover, D. M. and Giet, R. (2010). Aurora A contributes to p150(glued) phosphorylation and function during mitosis. *J Cell Biol.* **189**(4), 651-9.

Sasai, K., Parant, J. M., Brandt, M. E., Carter, J., Adams, H. P., Stass, S. A., Killary, A. M., Katayama, H. and Sen, S. (2008). Targeted disruption of Aurora A causes abnormal mitotic spindle assembly, chromosome misalignment and embryonic lethality. *Oncogene.* **27**(29), 4122-7.

Schumacher, J. M., Ashcroft, N., Donovan, P. J., Golden, A. (1998). A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of

developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development*. **125**(22), 4391-402.

Seki, A., Coppinger, J. A., Jang, C. Y., Yates, J. R. and Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*. **320**(5883), 1655-8.

Schmidt, S., Schneider, L., Essmann, F., Cirstea, I. C., Kuck, F., Kletke, A., Jänicke, R. U., Wiek, C., Hanenberg, H., Ahmadian, M. R., Schulze-Osthoff, K., Nürnberg, B. and Piekorz, R. P. (2010). The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. *Oncogene*. **29**(46), 6184-92.

Suijkerbuijk, S. J., van Dam, T. J., Karagöz, G. E., von Castelmur, E., Hubner, N. C., Duarte, A. M., Vleugel, M., Perrakis, A., Rüdiger, S. G., Snel, B. and Kops, G. J. (2012). The vertebrate mitotic checkpoint protein BUBR1 is an unusual pseudokinase. *Dev Cell*. **22**(6), 1321-9.

Tanaka, M., Ueda, A., Kanamori, H., Ideguchi, H., Yang, J., Kitajima, S. and Ishigatsubo, Y. (2002). Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J Biol Chem*. **277**(12), 10719-26.

Thornton, B. R. and Toczyski, D. P. (2003). Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nat Cell Biol*. **5**(12), 1090-4.

Uhlmann, F., Lottspeich, F. and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*. **400**(6739), 37-

Vassilev, L. T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D. C. and Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(28), 10660-5.

Zhang, X., Ems-McClung, S. C. and Walczak, C. E. (2008). Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity. *Mol Biol Cell*. **19**(7), 2752-65.

Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R. and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*. **20**(2), 189-93.

Figure legends

Figure 1: Inhibition of Aurora-A kinase activity during the mitotic progression

(A) Methods used for cell synchronization allowing Aurora-A inhibition in late prometaphase. Cells were first depleted for Aurora-A by siRNA and synchronised in prometaphase by incubation at 37°C for 5h with the inhibitor of CDK1 RO3306, washed with PBS and followed by incubation in McCoy's 5A containing GluthaMAX for 10 min (T10). Cells were then treated with 1-Na-PP1 for 30 min, fixed and processed for microscopy.

(B) Western Blot showing the depletion of endogenous Aurora-A kinase and the level of expression of as-Aurora-A or wt-Aurora-A both GFP-tagged in both U2OS stable cell lines. β -Tubulin was used as a loading control.

(C) Immunofluorescence microscopy showing the equatorial plates in control U2OS cells (control), U2OS stable cell lines depleted for endogenous Aurora-A but expressing wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS) counterstained with Vectashield containing DAPI (DNA). The congression index measured corresponds to the index ratio between the width and height of the equatorial plates (W/H), white arrows. Scale bar = 10 μ m.

(D) Box plot showing the congression index measured in the three different cell lines.

(E) Staining used to detect mitotic cells. Left panel shows DAPI staining and right panel immuno-staining of serine 10 phosphorylation in histone H3. Scale bar is 10 μ m.

(F) The graph shows the percentage of mitotic cells in control U2OS cells (control), and U2OS stable cell lines depleted for endogenous Aurora-A but expressing wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS)

Figure 2: Kinetics of exit of mitosis in the presence of nocodazole.

(A) Methods used to analyse the effect of Aurora-A inhibition on the SAC. Cells were first

depleted for Aurora-A by siRNA and treated with nocodazole for 16 h to drive them in mitosis where they should remain. 13h after incubation in nocodazole, cells were treated with the 1-Na-PP1 to inhibit as-Aurora-A and filmed for 3 hours. The addition of 1-Na-PP1 marks the T0 for each film.

(B) The graph represents kinetics of mitosis exit in the presence of nocodazole and 1-Na-PP1 of stable cells lines depleted for endogenous Aurora-A but expressing wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS). The dark grey lines correspond to mitosis and light grey to interphase (exit from mitosis).

(C) Snap shots of movies corresponding to stable cells lines depleted for endogenous Aurora-A but expressing wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS) and treated with nocodazol.

(D) The graph represents percentage of cells in mitosis in stable cells lines depleted for endogenous Aurora-A but expressing wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS).

Figure 3: localization of Mad2 and BubR1 upon inhibition of Aurora-A kinase activity.

(A) Control, wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS) stable cell lines immunostained to detect α -Tubulin (green) and Mad2 (red) and counterstained for DNA with Vectashield containing DAPI during late prometaphase under Aurora-A inhibition. Scale bar = 10 μ m.

(B) The graph shows the number of cells with a normal localization of Mad2 in the experiments in (A) during late prometaphase.

(C) The graph shows the integrated density of Mad2 at kinetochores and centrosomes in the experiment in (A) during late prometaphase.

(D) Control, wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS) stable cell lines immunostained to detect α -Tubulin (green) and BubR1 (red) and counterstained for DNA with Vectashield containing DAPI during late prometaphase under Aurora-A inhibition. Scale bar = 10 μ m.

(E) The graph shows the number of cells with a normal localization of BubR1 in the

experiment in (D) during late prometaphase.

(F) The graph shows the integrated density of BubR1 at kinetochores in the experiment in (D) during late prometaphase.

(G) Western blots showing the efficiency of endogenous Aurora-A depletion and exogenous wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS) expression in both stable cell lines. Mad2 and BubR1 were controlled in Aurora-A depleted cells treated with 1-Na-PP1. Cyclin B1 was used as mitotic marker. HCAP-D2 was used as a loading control.

Figure 4: Effect of expression of P150Glued S19A and S19D on Mad2 localisation at kinetochores

(A) The percentage of prometaphase cells showing Mad2 at kinetochores was determined in U2OS cells expressing as-Aurora-A and either wt-P150Glued or P150Glued S19A or S19D. This was analysed in three conditions: without any treatment, in condition where endogenous Aurora-A was depleted (siRNA Aurora-A) or in condition where endogenous Aurora-A was depleted and as-Aurora-A inhibited by 1-Na-PP1 (siRNA Aurora-A + 1-Na-PP1).

(B) Western blots showing the efficiency of endogenous Aurora-A depletion, expression of as-Aurora-A GFP-tagged and expression of endogenous p150Glued and exogenous p150Glued S19A and S19D both HA-tagged (Reboutier et al., 2013). β -tubuline was used as a loading control.

Figure S1: Evolution of the Mitotic Index under inhibition of Aurora-A kinase activity.

(A) Cells with DNA stained with DAPI used to calculate the number of cells in mitosis. Scale bar = 10 μ m.

(B) The graph shows the percentage of cells in mitosis for control U2OS cells, and U2OS stable cell lines depleted for endogenous Aurora-A but expressing wt-Aurora-A (WT) or as-

Aurora-A (AS) and treated with 1-Na-PP1 .

(C) Percentage of mitotic cells in the different times 5 min (T5), 10 min (T10), and 15 min (T15) after addition of the inhibitor 1-Na-PP1.

Figure S2: Kinetics of exit of mitosis in the presence of paclitaxel.

Like for treatment with nocodazole cells were first depleted for Aurora-A by siRNA and treated with paclitaxel for 16 h to drive them in mitosis where they should remain. 13h after incubation in paclitaxel, cells were treated with the 1-Na-PP1 to inhibit as-Aurora-A and filmed for 3 hours. The addition of 1-Na-PP1 marks the T0 for each film.

(A) Snap shots of movies corresponding to stable cells lines depleted for endogenous Aurora-A but expressing wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS) and treated with paclitaxel.

(B) The graph represents kinetics of mitosis exit in the presence of paclitaxel and 1-Na-PP1 of stable cells lines depleted for endogenous Aurora-A but expressing wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS). The dark grey lines correspond to mitosis and light grey to interphase (exit from mitosis).

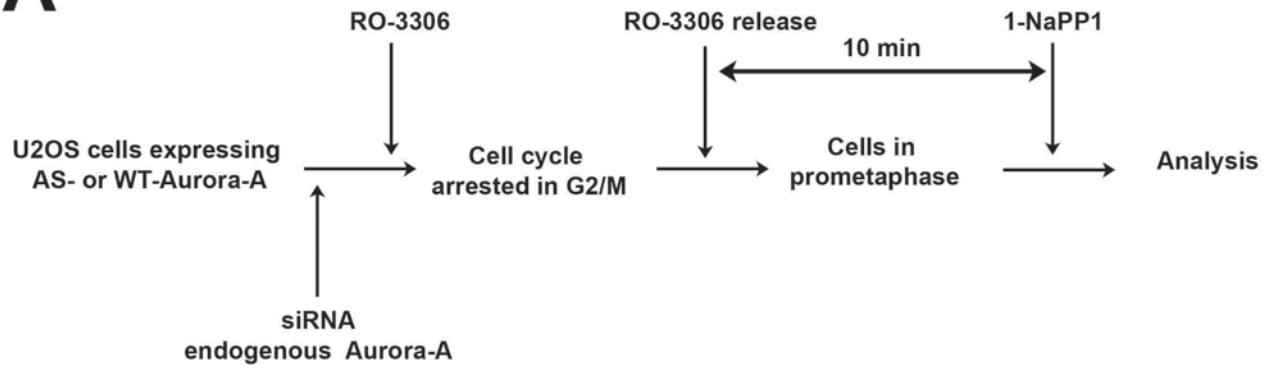
(C) The graph represents percentage of cells in mitosis in stable cells lines depleted for endogenous Aurora-A but expressing wt-Aurora-A (WT) and as-Aurora-A (AS).

Figure S3: Video-microscopy of cells'exit from mitosis in the presence of nocodazole and under inhibition of the activity of Aurora-A kinase activity

(A) Live cell images showing wt-Aurora-A (WT) stable cell lines, depleted of endogenous Aurora-A and treated with the inhibitor 1-Na-PP1 in the presence of nocodazole

(B) Live cell images showing as-Aurora-A (AS) stable cell lines, depleted of endogenous Aurora-A and treated with the inhibitor 1-Na-PP1 in the presence of nocodazole

A

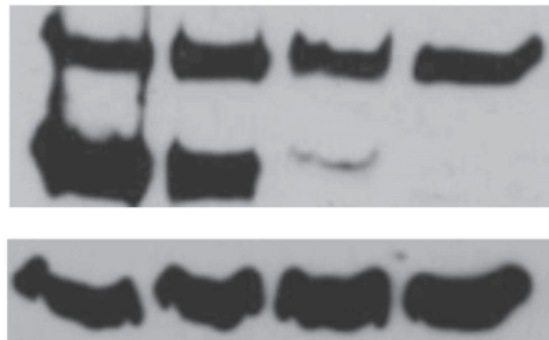


B

WT or AS-Aurora-A GFP-tagged

endogenous Aurora-A

β -tubulin



Aurora-A siRNA

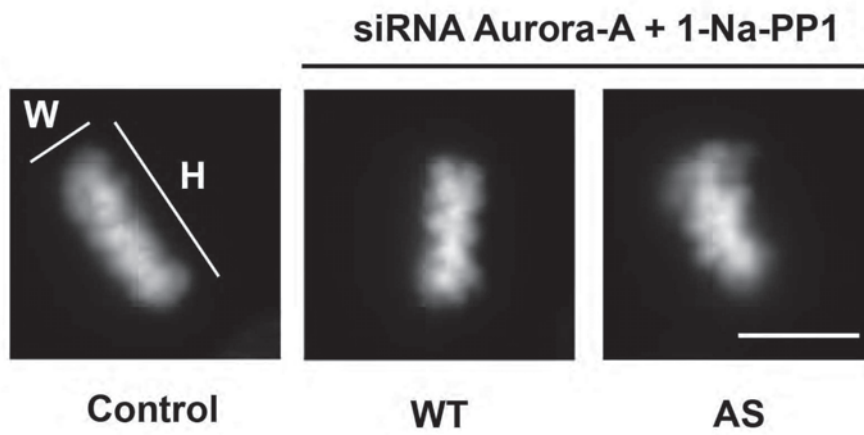
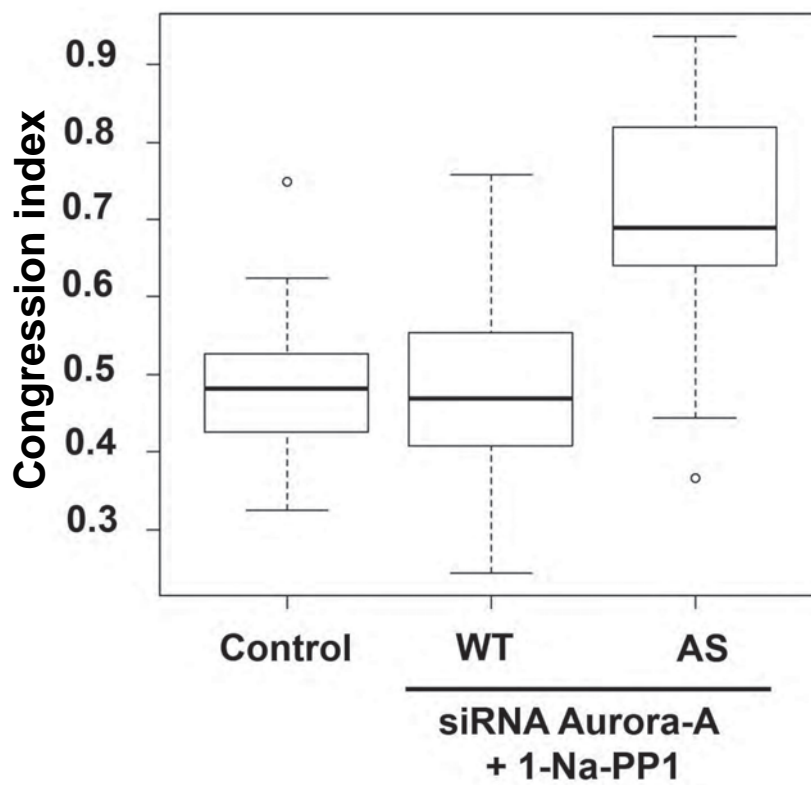
— — + +

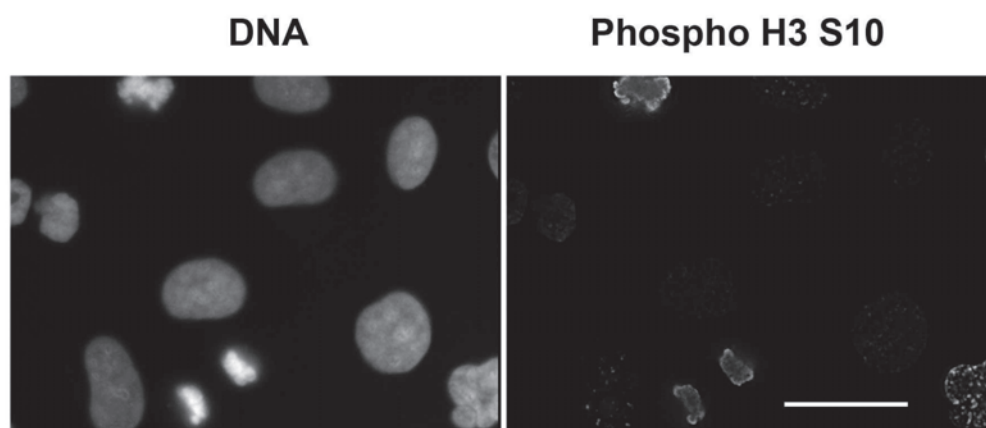
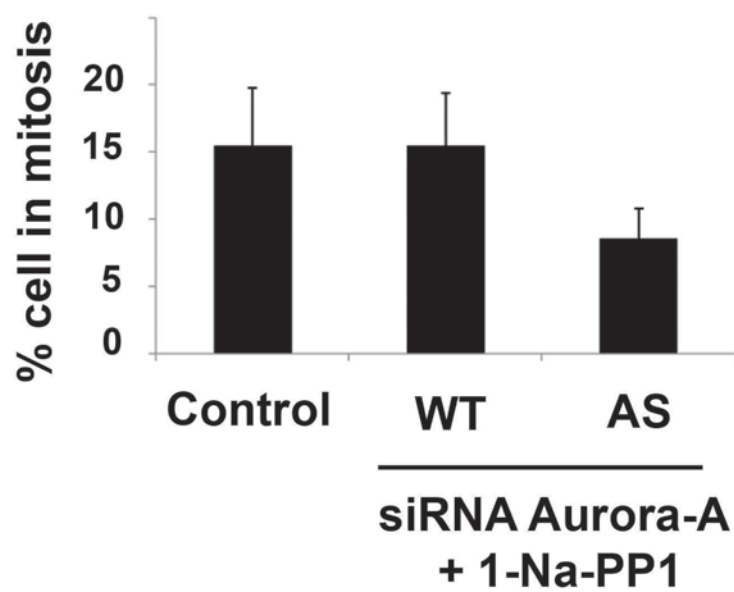
WT-Aurora-A

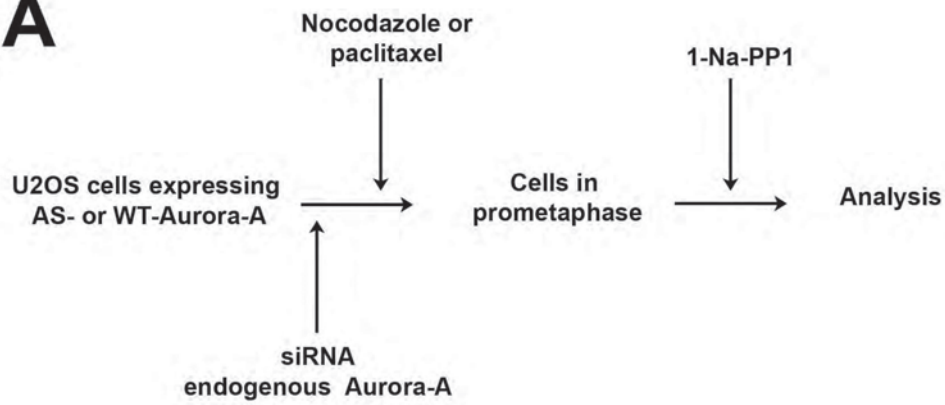
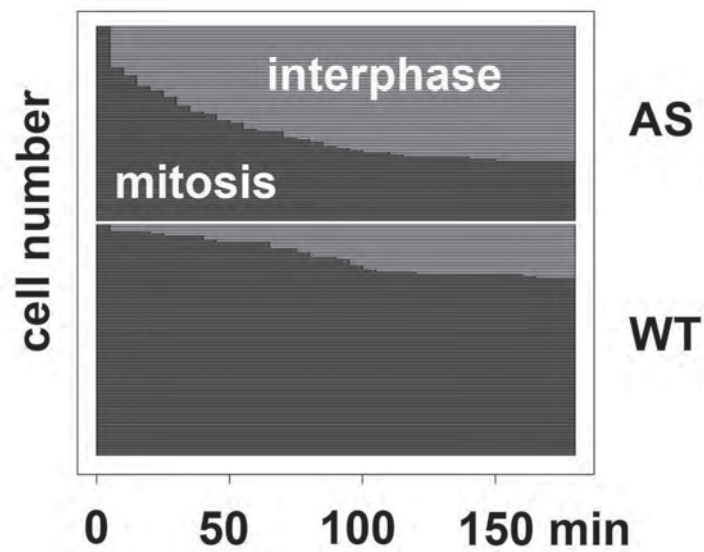
+ — + —

AS-Aurora-A

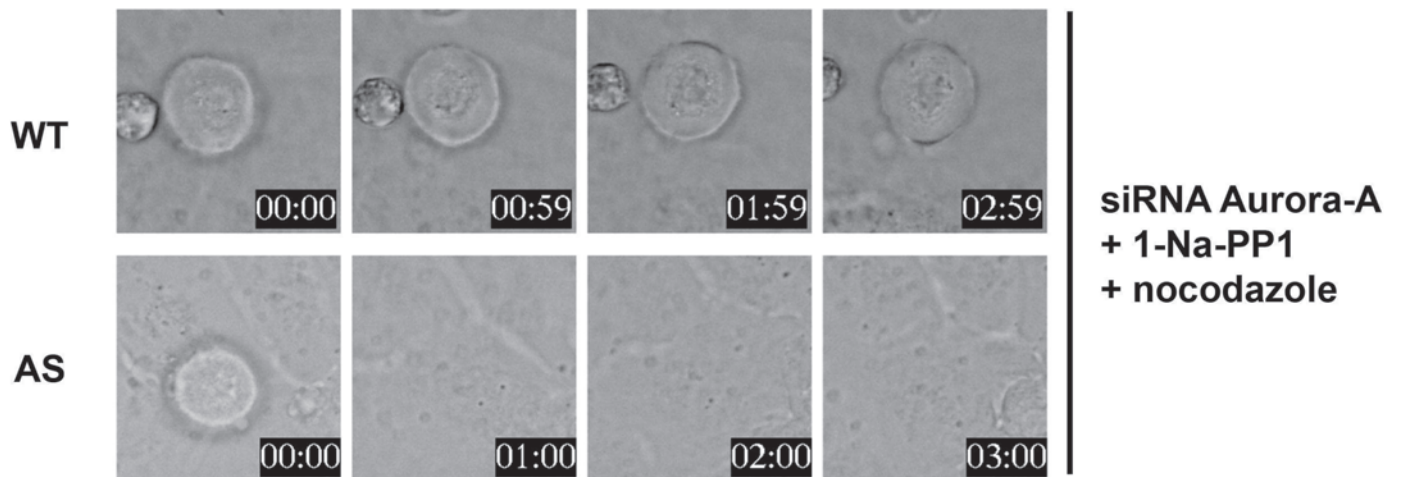
— + — +

C**D**

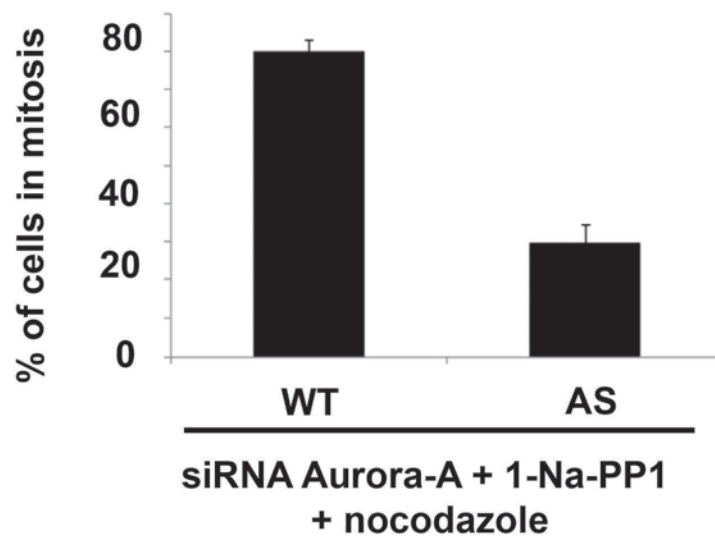
E**F**

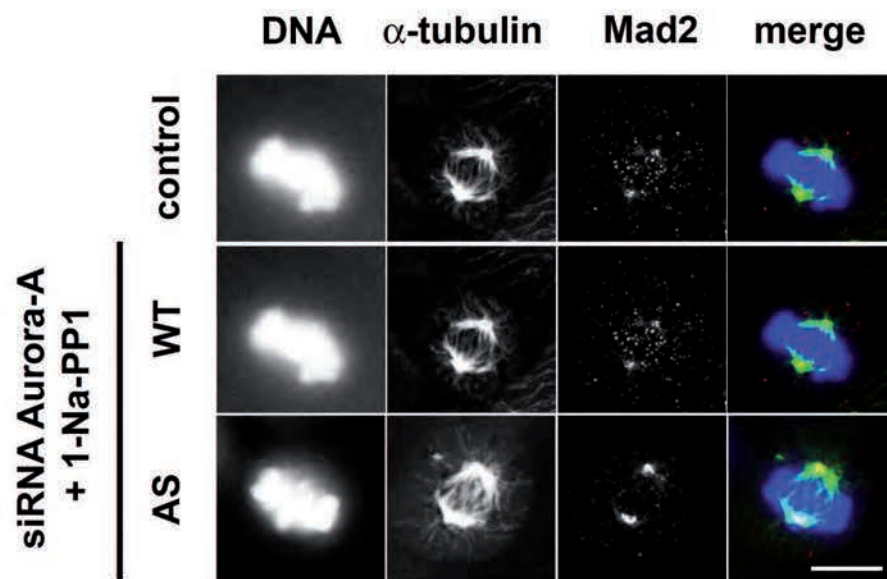
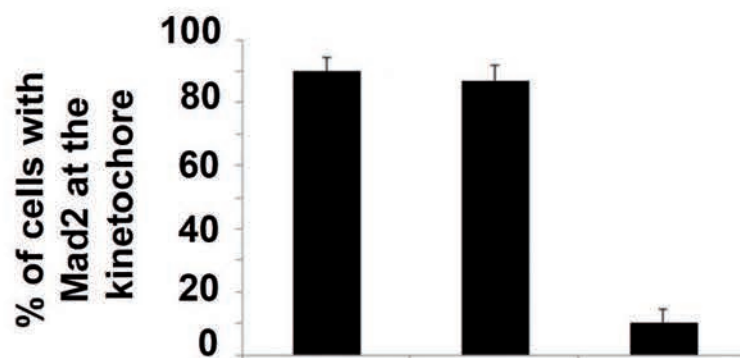
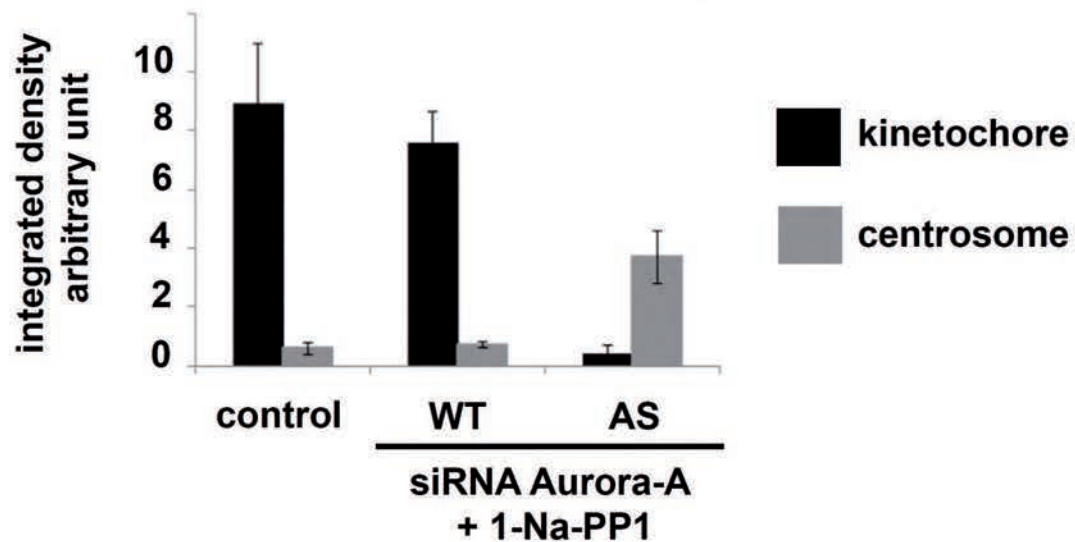
A**B**

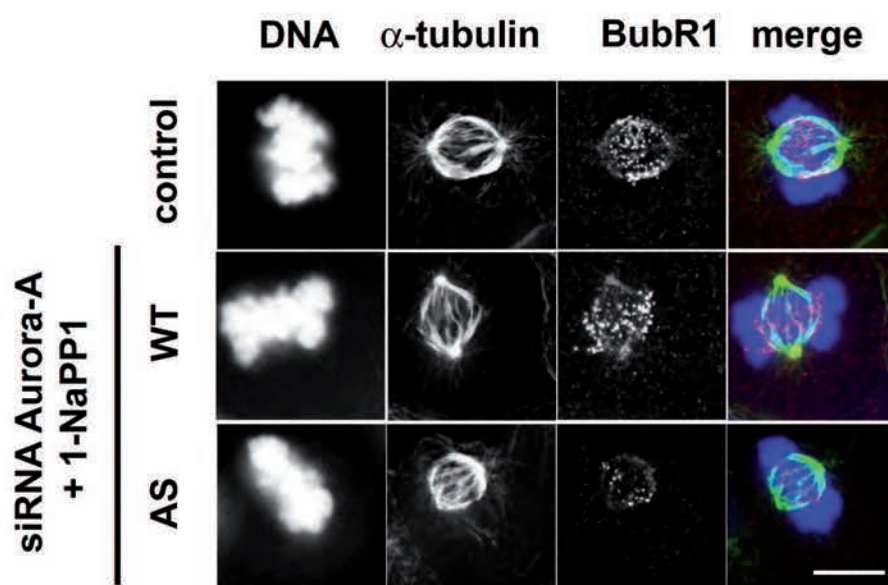
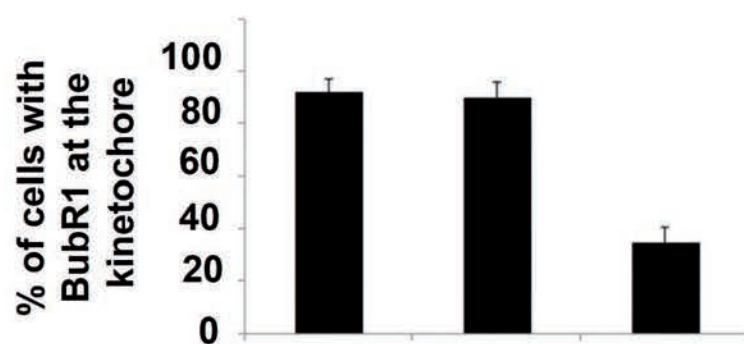
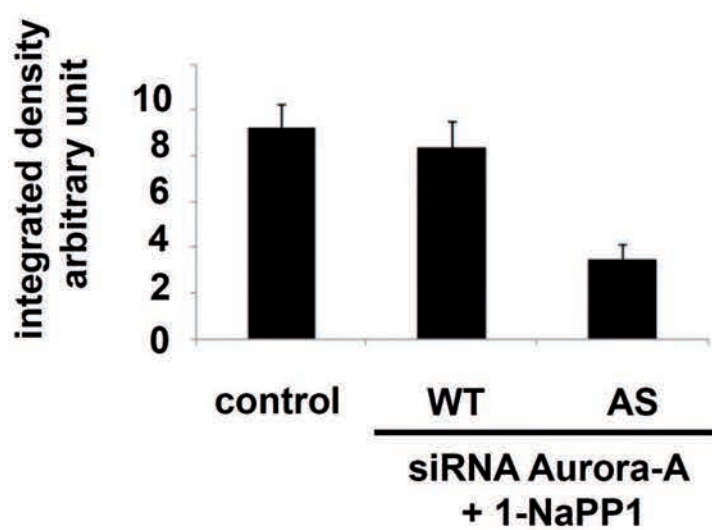
C



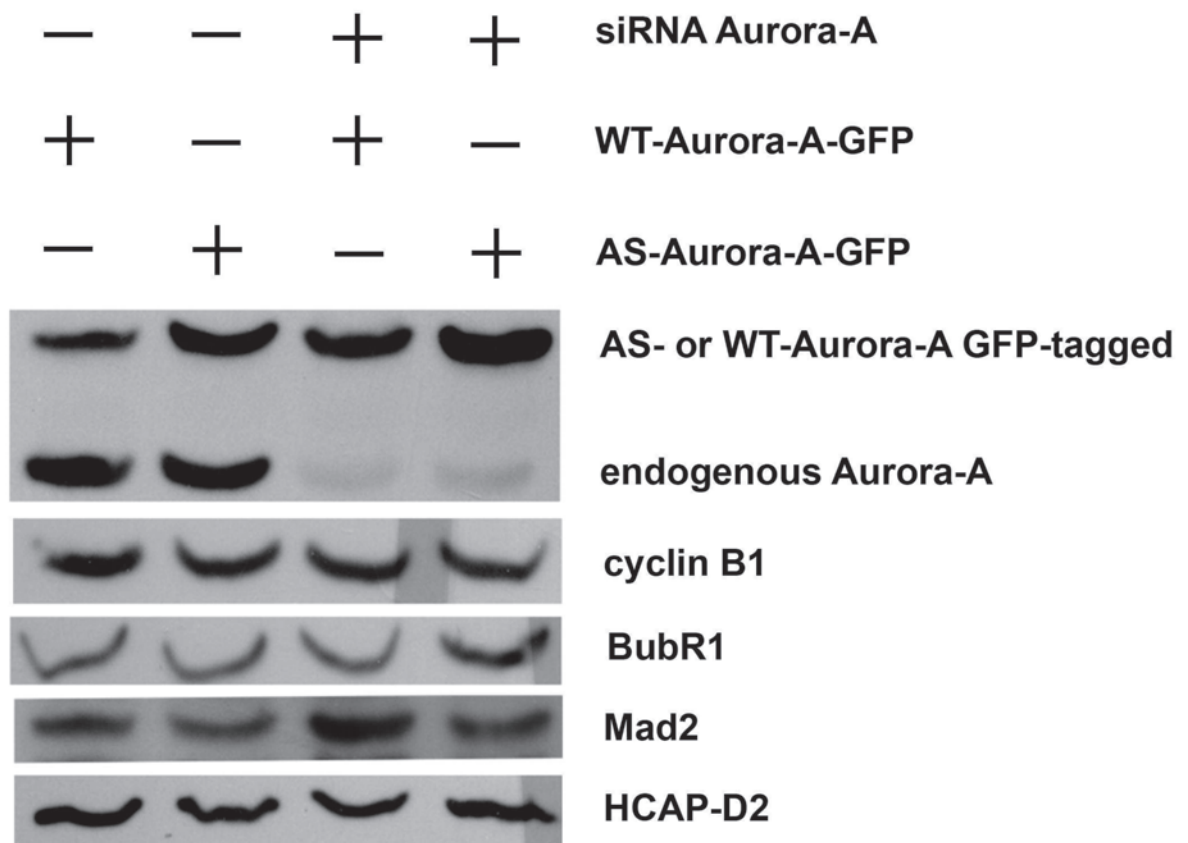
D

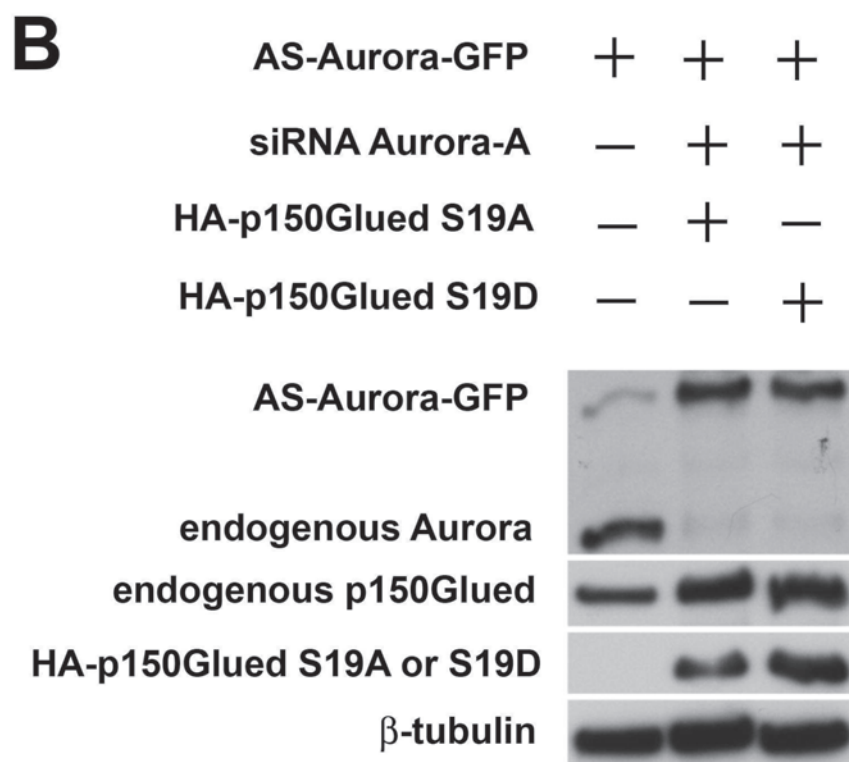
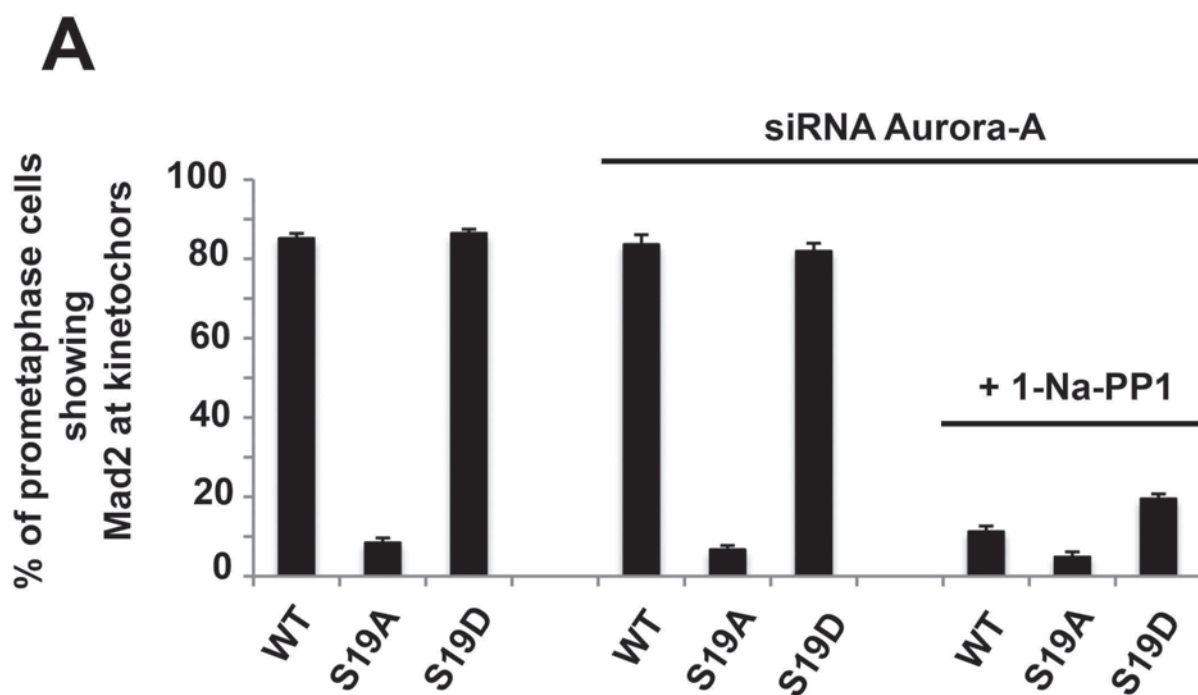


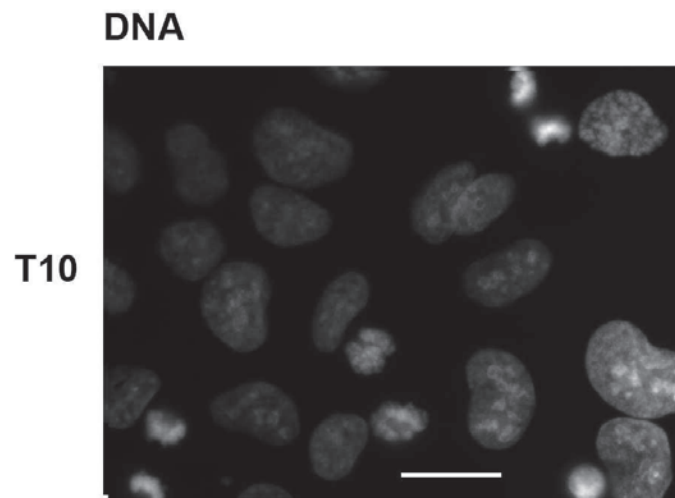
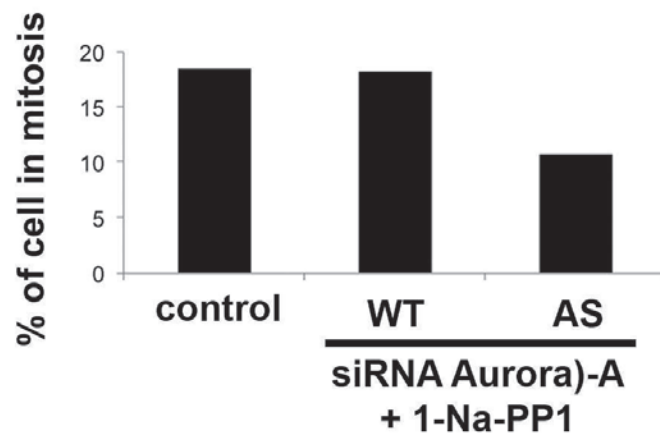
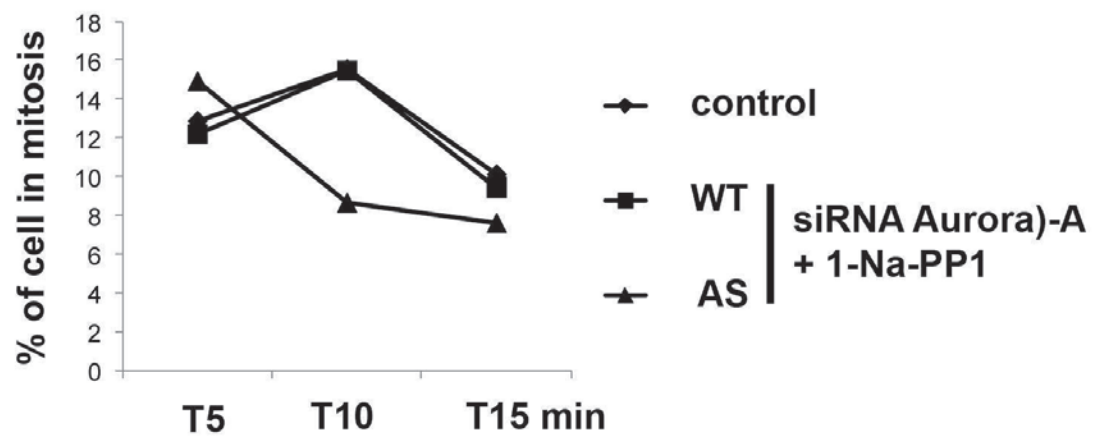
A**B****C**

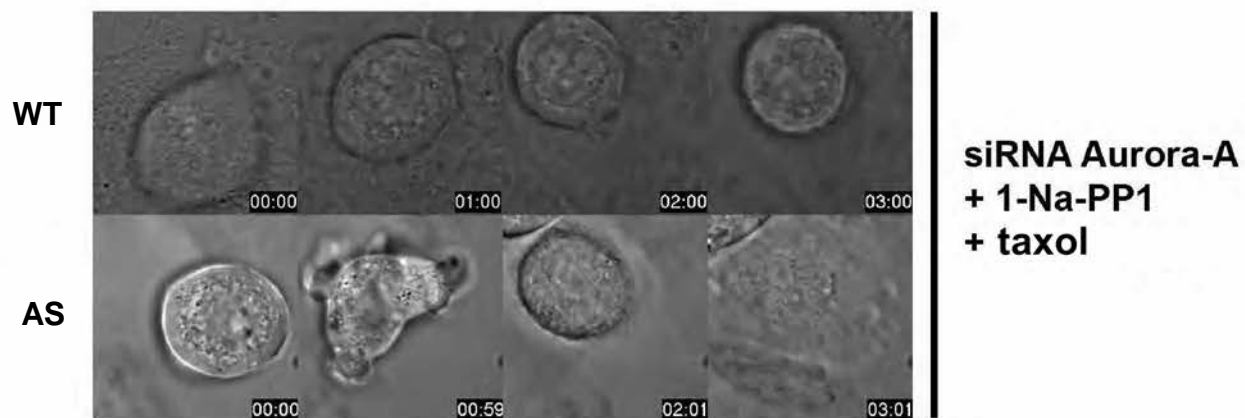
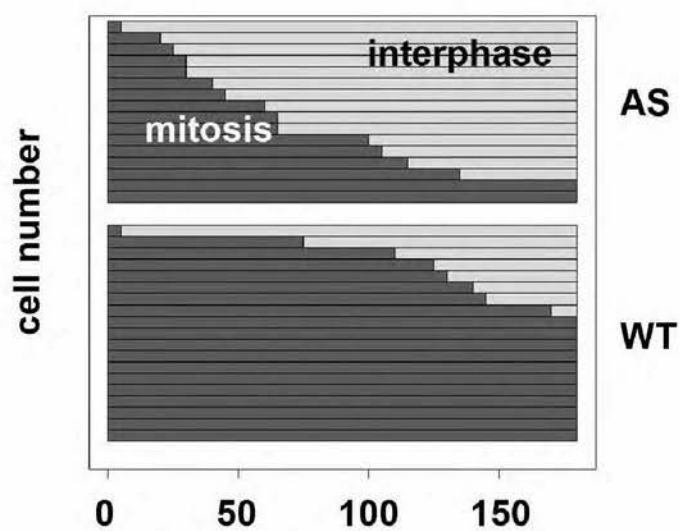
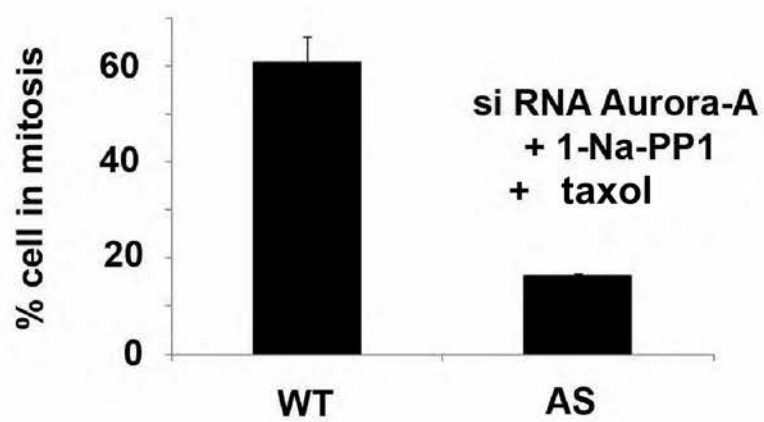
D**E****F**

G





A**B****C**

A**B****C**

Conclusion et perspectives

L'utilisation de l'approche génétique chimique nous a permis d'étudier les fonctions de la kinase Aurora-A dans les phases tardives de la mitose. Ainsi, nous avons pu montrer que la kinase Aurora-A possédait des fonctions au-delà de celles déjà décrites pour le début de la mitose.

Quel rôle la kinase Aurora-A pourrait-elle jouer en fin de prométaphase ?

Les résultats de nos observations montrent que la kinase Aurora-A est fortement impliquée dans la bonne progression et l'aboutissement de la mitose. Nous avons utilisé l'approche chimie génétique pour inhiber, très rapidement et spécifiquement à un moment précis de la mitose, l'activité de la kinase Aurora-A. Nous avons pu montrer qu'elle est requise pour la congression des chromosomes en prométaphase. Nos résultats montrent que l'index de congression augmente d'environ 1,5 fois par rapport aux contrôles suite à l'inhibition de l'activité kinase de Aurora-A. Déjà, de précédentes études ayant utilisé soit la déplétion, l'injection d'anticorps, les dominants négatifs (Katayama et al., 2001 ; Marumoto et al., 2003 ; Kunitoku et al., 2003 ; Girdler et al., 2006 ; Liu and Ruderman, 2006 ; Hoar et al., 2007 ; Kim et al., 2010) ou un inhibiteur chimique des kinases Aurora (Manfredi et al., 2007 ; Hoar et al., 2007 ; Wysong et al., 2009) ont pu établir le rôle de la kinase Aurora-A dans l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique.

Toutefois, des résultats similaires ont été aussi obtenus avec la kinase Aurora-B (Adams et al., 2001a ; Adams et al., 2001b ; Kallio et al., 2002 ; Murata-Hori et al., 2002 ; Murata-Hori and Wang, 2002 ; Ditchfield et al., 2003 ; Hauf et al., 2003 ; Kunitoku et al., 2003 ; Becker et al., 2010) ou avec leur ancêtre commun la kinase

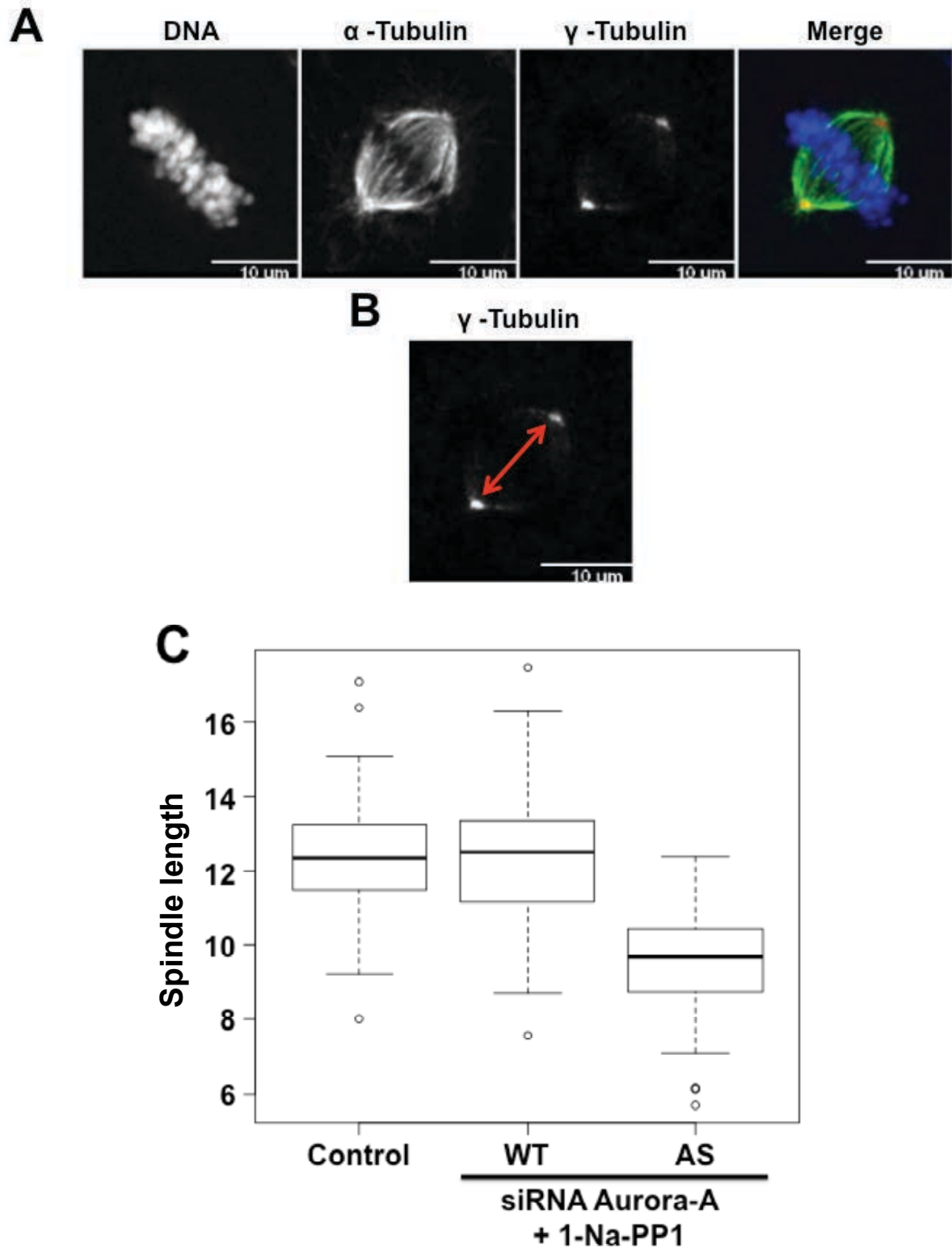


Figure 31 : (A) et (B) marquage par immunofluorescence pour mesurer la taille du fuseau mitotique (distance entre les deux centrosomes) après inhibition de l'activité de Aurora-A en prométaphase. L'ADN est représenté en bleu, α -tubuline (microtubules) en vert et la γ -tubuline (centrosomes) en rouge. Barre d'échelle 10 μ m. (C) Boîte à moustache (boxplot) représentant les tailles des fuseaux des lignées cellulaires stables U2OS (Contrôle, WT et AS) en fin prométaphase avec des plaques métaphasiques suffisamment constituées.

lpl1 (Tanaka et al., 2002). De plus, il a été rapporté récemment que l'inhibition séparée des Kinases Aurora-A et -B produisait non seulement les mêmes défauts d'alignement chromosomique mais surtout que leur association fonctionnelle était essentielle pour la ségrégation des chromosomes en anaphase (Hégarat et al., 2011). Cependant, d'après les résultats de déplétion, la kinase Aurora-A semble jouer un plus grand rôle que la kinase Aurora-B dans l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique (Kunitoku et al., 2003). Ceci s'expliquerait par le fait que c'est la kinase Aurora-A qui régule l'assemblage et la stabilité du fuseau mitotique. Le fuseau mitotique est la véritable plateforme d'ancrage et de motilité des chromosomes. Ainsi, la perturbation de la Kinase Aurora-A conduirait évidemment à la désorganisation du fuseau mitotique (Kufer et al., 2002 ; Manfredi et al., 2007 ; Hoar et al., 2007 ; Wysong et al., 2009). En effet, nos résultats montrent que la taille du fuseau mitotique diminue sous l'inhibition de l'activité kinase de Aurora-A en fin de prométaphase (**Figure 31**). Toute désorganisation du fuseau mitotique conduirait inéluctablement à un défaut d'attachement des kinétochores aux microtubules. Ainsi, les défauts d'attachement bloquent la congression des chromosomes sur la plaque métaphasique (Green and Kaplan, 2003).

Par ailleurs, Tex14, recrutée aux kinétochores par PLK1 (un substrat de la kinase Aurora-A), est requise pour le recrutement des protéines de la structure externe des kinétochores. Ce sont ces protéines de la couche externe des kinétochores qui régulent les attachements Kinétochores-Microtubules (Mondal et al., 2012). De même, la phosphorylation de CENP-A sur sa sérine 7 par la kinase Aurora-A est requise dans les attachements Kinétochores-Microtubules. Cette phosphorylation permet de concentrer la kinase Aurora-B au centromère, et est nécessaire au fonctionnement des kinétochores (Kunitoku et al., 2003). Enfin, SAF-A

interagit avec le complexe Aurora-A-TPX2. Cette association est essentielle pour les attachements Kinétochores-Microtubules et la congression (Ma et al., 2011).

Par contre, la kinase Aurora-B est la clé de voûte de la correction des erreurs des attachements Kinétochores-Microtubules. Elle assure aussi leur stabilisation (Biggins et al., 1999 ; Biggins and Murray, 2001 ; He et al., 2001 ; Cheeseman et al., 2002 ; Tanaka et al., 2002 ; Cimini et al., 2003 ; Hauf et al., 2003 ; Lampson et al., 2004 ; Ducat and Zheng, 2004 ; Andrews et al. 2004 ; Lan et al. 2004 ; Ohi et al. 2004 ; Tanaka et al., 2005 ; Pinsky and Biggins, 2005 ; Cimini et al., 2006 ; DeLuca et al., 2006 ; Knwolton et al., 2006 ; Cimini D., 2007 ; Ruchaud et al., 2007 ; Zhang et al. 2007 ; Tanaka T.U., 2008 ; Tanaka and Hirota, 2009 ; Keating et al., 2009 ; Tanaka, 2010).

Pendant la mitose, si les cellules ne congrègent pas correctement, elles restent anormalement bloquées en prométaphase. Ceci permet aux cellules de parfaire l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphase. Paradoxalement, nos résultats montrent que l'index mitotique diminue presque de moitié chez les cellules exprimant la kinase Aurora-A Shokat après l'inhibition de l'activité de la kinase Aurora-A. Toutefois, la déplétion ou l'inhibition de la kinase Aurora-A dans des populations de cellules asynchrones ou bloquées à la thymidine génère leur accumulation en G2/M après relargage (Glover et al., 1995 ; Hirota et al., 2003 ; Marumoto et al., 2003 ; Hata et al., 2005 ; Liu and Ruderman, 2006 ; Manfredi et al., 2007 ; Wysong et al., 2009). En outre, cette déplétion de la kinase Aurora-A allongerait la progression de la mitose-même au delà de l'entrée en mitose (Song et al., 2009). Néanmoins, une fois que le fuseau bipolaire est mis en place, l'inhibition de la kinase Aurora-A ne semble pas induire un délai dans la progression de la mitose. A cet effet, Wysong et al. (2009) montrent une diminution significative des

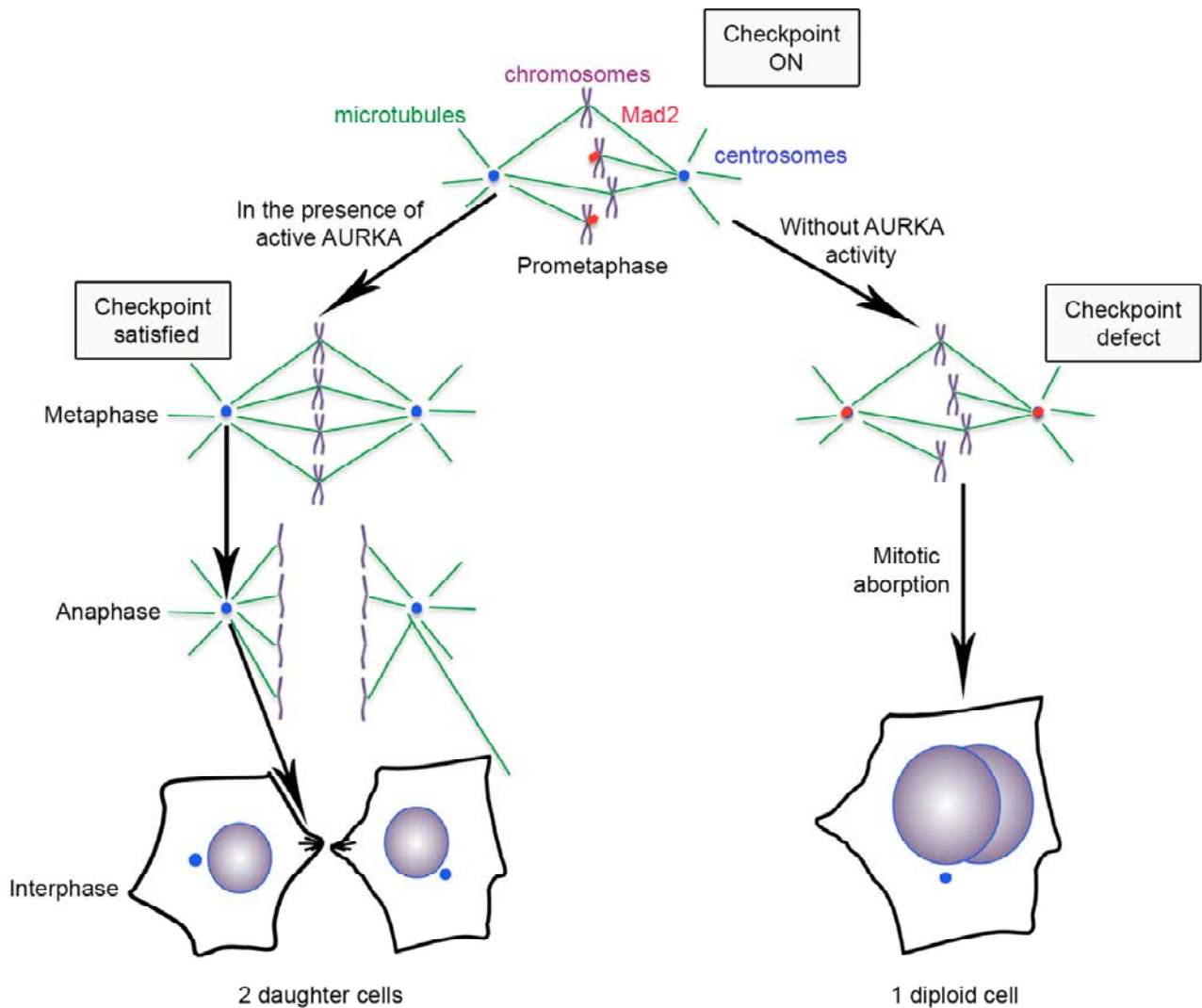


Figure 32 : schéma illustrant la nécessité de l'activité kinase de Aurora-A dans le maintien du SAC actif. Durant prométaphase, le signal du checkpoint est généré par la présence des protéines du checkpoint (Mad2) aux kinétochores non attachés aux microtubules du fuseau mitotique. En présence d'une activité Aurora-A, le SAC reste actif jusqu'à ce que tous les chromosomes soient correctement alignés autour de la plaque métaphasique. Ainsi, la ségrégation des chromosomes se passe normalement en anaphase et la division cellulaire aboutit à deux cellules filles identiques. Par contre, le manque d'activité Aurora-A induit un défaut de checkpoint qui conduit à la diploïdisation des cellules.

cellules positives en H3S10 en présence de taxol après déplétion de la kinase Aurora-A. Au contraire, des cellules ayant mal congrégé progressent dans la mitose sans avoir corrigé leurs défauts mitotiques. Ceci suggérerait que le point de contrôle de la mitose (SAC) ne semble pas remplir correctement son rôle de frein mitotique.

Le SAC peut-il rester actif en l'absence de l'activité kinase de Aurora-A ?

Malgré un index de congression élevé, les cellules exprimant la kinase Aurora-A Shokat ne restent pas anormalement bloquées en prométaphase. La chute de l'index mitotique en l'absence d'activité kinase Aurora-A indique que les cellules s'échappent au point de contrôle de la mitose (SAC) et poursuivent la division cellulaire. Donc, l'activité kinase de Aurora-A est fortement requise pour maintenir un checkpoint actif (Figure 32).

Nos résultats montrent que l'inhibition de l'activité de la kinase Aurora-A outrepassa massivement le SAC en présence des poisons des microtubules. Les cellules exprimant la kinase Shokat sortent rapidement du blocage induit par ces poisons alors que les cellules contrôles qui sortent le font majoritairement tardivement. Ces sorties de mitose s'accompagnent parfois de réversion de la cytokinèse aboutissant à la multinucléation. La multinucléation cellulaire aboutirait à l'aneuploïdie (Meraldi et al., 2002) qui est une des causes du cancer. Nous avons aussi observé que certaines cellules sortent de mitose en déformant leurs membranes cytoplasmiques (blebbing). Ce phénomène qui succède à l'anaphase indique la C phase (Cytokinesis phase) (Canman et al., 2000 ; Shannon et al., 2002). Ces résultats concordent avec ceux précédemment obtenus par Wysong et al. (2009). Dans leur étude, ils ont démontré que l'inhibition de la kinase Aurora-A en présence du taxol par le MLN8054 accélérât le mitotic slippage. Déjà, l'inhibition de

la kinase Aurora-A par microinjection d'un anti-Aurora-A (Marumoto et al., 2003) ou avec le MLN8054 (Hoar et al., 2007 ; Manfredi et al., 2007) laissait supposer un rôle de Aurora-A dans le fonctionnement du SAC. Leurs cellules ont progressé dans la mitose malgré des défauts d'alignement. Ceci a abouti à des chromosomes à la traîne (lagging chromosomes), des ponts chromosomiques en télophase, à la multinucléation et à l'aneuploïdie. En somme, tous ces résultats montrent bien que l'activité de la kinase Aurora-A est fortement requise pour le maintien d'un SAC actif. Cependant, des résultats similaires ont été aussi obtenus avec l'inhibition de la kinase Aurora-B (Kallio et al., 2002 ; Ditchfield et al., 2003 ; Hauf et al., 2003 ; Girdler et al., 2006 ; Tyler et al., 2007).

Toutefois, dans ces études à l'exception de celle de Hauf et ses collègues (Hesperadin), l'inhibition de l'activité kinase de Aurora-A ou -B a été effectuée avec des inhibiteurs pan-Aurora. Le MLN8054 (Hoar et al., 2007 ; Wyszynski et al., 2009), le ZM447439 (Ditchfield et al., 2003 ; Girdler et al., 2006) et le VX-680 (Tyler et al., 2007) inhibent à la fois les trois kinases de la famille Aurora (A, B et C) ou tout au moins Aurora-A et -B (Dar et al., 2010) même si c'est à des concentrations différentes. Par exemple, Ditchfield et al. (2003) trouvent que le ZM447439 inhibe l'activité kinase de Aurora-A et -B avec des IC_{50} de 0,11 et 0,13 μ M respectivement. Dans des cellules TC (Thyroid cancer), le MLN8054 inhibe les trois kinases Aurora (Wunderlich et al., 2011). Contrairement à ces différents inhibiteurs, l'inhibiteur de la kinase Aurora-A (AS), le 1-Na-PP1, offre l'avantage d'être spécifique à la kinase Aurora-A Shokat. Elle n'a pas d'autres cibles dans la cellule.

Par ailleurs, la surexpression de la kinase Aurora-A abroge le SAC activé par le taxol ou le nocodazole (Anand et al., 2003 ; Jiang et al., 2003), Il semblerait que la surexpression de la kinase Aurora-A soit à la base de la dissociation des complexes

du checkpoint (MCC). Le MCC comprend deux sous-complexes différents constitués par deux protéines clés, Mad2 et BubR1. Mad2 est recruté au kinétochores en réponse aux défauts d'attachement alors que BubR1 l'est quand la tension baisse. Ces deux sous-complexes inhibent indépendamment l'APC/C en séquestrant la CDC20. Ceci empêche la sortie de mitose (Fang, 2002 ; Peters et al., 2006 ; Shah et al., 2004 ; Skoufias et al., 2001 ; Sudakin et al., 2001 ; Waters et al., 1998). Dans cette situation, BubR1 est drastiquement réduit et CDC27, une sous-unité de l'APC/C, n'est pas phosphorylé (Jiang et al., 2003). Mais cette réduction observée par western blot semble indiquer une dégradation de BubR1 dans la cellule. Par contre, d'après une étude récente (Katayama et al., 2012), c'est la phosphorylation de p73 sur sa sérine 235 par la kinase Aurora-A qui dissocie le complexe Mad2-CDC20 alors que complexe BubR1-CDC20 reste intact.

Le maintien de BubR1 et Mad2 aux kinétochores serait-elle dépendante de l'activité kinase de Aurora-A ?

Contrairement à l'étude de Wysong et ses collègues (2009), nos résultats montrent que les deux protéines-clés du MCC, BubR1 et Mad2, sont anormalement affectées. En effet, la localisation de BubR1 au kinétochores est notablement réduite. Environ 2,6 fois moins de cellules exprimant la kinase Aurora-A (AS) présentent une localisation normale de BubR1 aux kinétochores par rapport aux cellules contrôles. De même, la densité de BubR1 aux kinétochores est réduite après l'inhibition de l'activité de la kinase Aurora-A Shokat. Toutefois, cette réduction de BubR1 aux kinétochores est beaucoup moins importante que celle issue de l'utilisation du siRNA Aurora-B, du ZM447439 ou de l'eupatorine (Ditchfield et al., 2003 ; Wysong et al., 2009 ; Salmela et al., 2012). Néanmoins, l'inactivation du SAC ne nécessite pas la

disparition complète de BubR1 aux kinétochores (Howell et al., 2004). Toutefois, BubR1 lierait plus fortement CDC20, et augmenterait la capacité de Mad2 à inhiber CDC20 (Fang, 2002 ; Sudakin et al., 2001).

Plus intéressant encore, nos résultats montrent que Mad2 diminue drastiquement ou disparaît aux kinétochores alors qu'il est fortement enrichi aux pôles du fuseau. Approximativement, il y a ~19,6 fois plus de cellules présentant une localisation normale de Mad2 aux kinétochores chez les contrôles que chez les cellules exprimant la kinase Aurora-A (AS). Auparavant, quelques études ont montré que Mad2 localisait aux pôle du fuseau en plus des kinétochores (Howell et al., 2000 ; Howell et al., 2004). Cependant, nos résultats montrent que sa densité aux pôles du fuseau est ~9 fois plus élevée après l'inhibition de la kinase Aurora-A Shokat. Contrairement à Jiang et al. (2003) qui montrent une forte diminution de BubR1 en surexprimant la kinase Aurora-A, les niveaux de Mad2 et BubR1 restent stables dans nos cellules.

Le mécanisme par lequel l'inhibition de l'activité de la kinase Aurora-A perturbe la localisation de Mad2 et BubR1 aux kinétochores puis outrepassé le SAC reste méconnu. Les protéines Mad2 et BubR1 sont réputées interagir avec la kinase Aurora-B. Donc, le lien ne semble pas être direct. Très probablement, la kinase Aurora-A phosphorylerait une ou plusieurs autres protéines impliquées dans le maintien de Mad2 et BubR1 aux kinétochores. Ainsi, en l'absence de l'activité de la kinase Aurora-A, cette phosphorylation est annihilée.

Pour répondre à cette question nous avons utilisé une approche candidat pour déterminer quel substrat de la kinase Aurora-A serait impliqué dans le maintien de Mad2 et BubR1 aux kinétochores. P150glued, une sous-unité de la dynactine qui forme un complexe avec la dynéine nous a paru un très bon choix. On sait que

p150glued est impliquée dans l'inactivation du checkpoint en délocalisant les protéines du kinétochore (Howel et al., 2001) pour les transporter le long des microtubules vers les pôles du fuseau. En outre, P150glued est un substrat de la kinase Aurora-A (Romé et al., 2010). Enfin, la phosphorylation de la sérine 19 de P150glued par la kinase Aurora-A est requise pour l'anaphase B (Reboutier et al., 2013). Nous avons donc essayé de sauver le phénotype Mad2 à l'aide d'un mutant mimant la phosphorylation constitutive de la sérine 19 de P150glued (S19D). Nous avons utilisé comme contrôle un mutant non phosphorylable de p150glued (S19A). Les résultats de cette expérience nous ont permis d'observer que :

- Le mutant S19A n'a pas pu sauver le phénotype de délocalisation de Mad2 aux kinétochores après inhibition de la kinase Aurora-A ;
- Le mutant S19A s'est comporté comme un dominant négatif confirmant ainsi le rôle de P150glued dans l'inactivation du checkpoint en délocalisant Mad2 aux kinétochores.

En conclusion, les résultats de nos travaux de recherche obtenus par l'utilisation d'une approche novatrice (génétique chimique) renforcent le rôle de régulateur-clé assigné à la kinase Aurora-A, et ce durant toute la mitose. Ces résultats montrent clairement que l'activité de la kinase Aurora-A n'est pas uniquement requise pour les événements qui se passent en début de mitose, largement détaillés dans la littérature. En outre, elle semble fortement requise tout au long du cycle cellulaire jusqu'aux phases tardives de la mitose. En effet, on a observé par vidéo-microscopie que l'inhibition spécifique de l'activité kinase de Aurora-A en fin de prométaphase induit non seulement un défaut de congression et de checkpoint de mitose mais, en plus, une réversion de la cytokinèse avec la formation de cellules multinucléées.

Le premier phénotype que nous avons observé en inhibant spécifiquement l'activité kinase de Aurora-A en fin de prométaphase est le défaut de congression. C'est la première fois que ce phénotype est directement spécifiquement relié à l'activité kinase de Aurora-A, bien qu'ayant été observé antérieurement dans d'autres études incluant les kinases Aurora-A et/ou -B. En effet, dans ces différentes études, "l'inhibition spécifique" de ces kinases est sujette à caution car ce sont des inhibiteurs pan-Aurora qui ont été utilisés. Des études ont montré que ces inhibiteurs ont la capacité d'inhiber plus ou moins fortement les kinases Aurora-A et -B voire même -C. Toutefois, le mécanisme moléculaire faisant le lien entre l'activité de la kinase Aurora-A et la congression des chromosomes n'est pas clairement établi. Il serait donc intéressant de poursuivre nos travaux de recherche dans ce sens pour déterminer quels sont les partenaires ou substrats de Aurora-A qui seraient directement impliqués dans ce processus bio-cellulaire. Une des pistes majeure, de recherche pourrait impliquer la cohésion des chromosomes. Peut-être que l'inhibition de l'activité kinase de Aurora-A induirait un défaut de cohésion (décohésion) des chromatides sœurs ayant comme conséquence l'impossibilité de congréger sur la plaque métaphasique. Par conséquent, il serait intéressant d'investiguer sur les chromosomes afin de faire un crible fonctionnel puisqu'il s'agit de l'activité fonctionnelle de la kinase Aurora-A par siRNA (extinction) ou par plasmide (extinction ou surexpression) pour déterminer de potentiels substrats de la kinase Aurora-A.

De même, nos résultats montrent que la phosphorylation de P150Glued est nécessaire mais pas suffisante pour maintenir le checkpoint actif durant la prométaphase. Par conséquent, le rôle de l'activité de la kinase Aurora-A dans le maintien du checkpoint actif nécessite d'autres acteurs non connus à jour. L'hypothèse que nous pouvons formuler à ce sujet est qu'il pourrait s'agir d'une

cascade de signalisation impliquant plusieurs acteurs. Il faudra donc chercher d'autres candidats, substrats ou partenaires de la kinase Aurora-A susceptibles d'intervenir dans ce mécanisme, les mutants homozygotes Aurora-A étant exclus car ne survivant pas au cours du développement. Cependant, la difficulté de l'approche candidat réside dans le fait qu'il y a un nombre élevé de partenaires avérés ou non de la kinase Aurora-A. Il serait très fastidieux et onéreux de tester toutes ses protéines. Aussi, il n'existe pas d'anticorps anti-phosphorylation disponibles pour un grand nombre de ces protéines. De plus, la localisation des protéines à elle seule n'étant pas toujours suffisante, il faudrait donc savoir si ces protéines sont actives ou non. Une autre approche intéressante que nous n'avons pas pu tester serait de purifier le MCC et de l'immunoprécipiter avec la kinase Aurora-A. Ceci pourrait donner des indications quant aux interactions qu'il pourrait y avoir entre la kinase Aurora-A et le SAC sans pour autant donner une garantie sur la fonctionnalité du lien *in vivo*. Enfin, une dernière technique qui pourrait rendre plus efficace l'approche candidat serait d'utiliser la méthode SILAC (stable isotope labelling by amino acids in cell culture). Cette méthode permet d'étudier les interactions protéines-protéines ainsi que leurs phosphorylations entre autres. Ceci permettrait par exemple de savoir quels sont les partenaires ou substrats de la kinase Aurora-A au niveau du checkpoint de mitose qui ne sont pas phosphorylés. Il pourrait être également intéressant de faire un crible fonctionnel pour déterminer des substrats fonctionnels de la kinase Aurora-A au niveau du point de contrôle de la mitose (SAC).

Références Bibliographiques

Abraham, R.T. and Jiang, W. (2005). Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol Biol Cell*, **16**:3187–3199.

Adams, R.R., Maiato, H., Earnshaw, W.C. and Carmena, M. (2001). Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and Aurora-B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J. Cell Biol.*, **153**, 865-880.

Adams, R.R., Wheatley, S.P., Gouldsworthy, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D.L. and Earnshaw, W.C. (2000). INCENP binds the aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol*, **10**:1075-1078.

Ambrosini, G., Adida, C. and Altieri, D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, **vol. 3, n° 8**, pp. 917-921.

Anand, S., Penrhyn-Lowe, S. and Venkitaraman, A.R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*, **3**, 51-62.

Andersen, C.B., Wan, Y., Chang, J.W., Riggs, B., Lee, C., Liu, Y., Sessa, F., Villa, F., Kwiatkowski, N., Suzuki, M., Nallan, L., Heald, R., Musacchio, A. and Gray, N.S. (2008). Discovery of selective aminothiazole aurora kinase inhibitors. *ACS Chem. Biol.*, **3**, 180-192.

Andreassen, P.R. and Margolis, R.L. (1994). Microtubule dependency of p34 cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *J. Cell Biol*, **127** : 789-802 .

Andrews, P.D., Knatko, E., Moore, W.J. and Swedlow, J.R. (2003). Mitotic mechanics: the Auroras come into view. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 672-683.

Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J.R. (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell.*, **6(2)**:253-68.

Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento E, Prinzi N, Guaitoli E, Favoriti P, Gnassi L, Moretti C, Bianchini M, Alessandrini S, Catania A, De Antoni E, Ulisse S. (2012). Aurora kinases: new molecular targets in thyroid cancer therapy. *Clin Ter.*, **163(6)**:e457-62.

Barros,T.P., Kinoshita, K., Hyman, A.A. and Raff, J.W. (2005). Aurora A activates D-TACCMsps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules. *J Cell Biol.*,**170**:1039-46.

Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I. and Conti, E. (2003). Structural Basis of Aurora-A Activation by TPX2 at the Mitotic Spindle. *Mol. Cell*, **12**, 851-862.

Berdnik, D. and Knoblich, J.A. (2002). Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis. *Curr. Biol.*, **12(8)**, 640-647.

Bernard, M., Sanseau, P., Henry, C., Couturier, A. and Prigent, C. (1998). Cloning of STK13, a third human protein kinase related to Drosophila aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics*, **53**: 406-409.

Biggins, S. and Murray, A.W. (2001). The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev.*, **15**:3118-3129.

Biggins, S. and Walczak, C.E. (2003). Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Curr. Biol.* **13**, R449-R460.

Bischoff, J.R. and Plowman, G.D. (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends in Cell Biology*,

9:454-9.

Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C.S.M., Novotny, M., Slamon, D.J. and Plowman, G.D. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO Journal*, **Vol.17 No.11** pp.3052-3065.

Bishop, J.D. and Schumacher, J.M. (2002). Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem*, **277(31)**: 27577-27580.

Blagosklonny, M.V. (2007). Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle*, **6**, 70-74.

Bolanos-Garcia, M (2004). Aurora Kinases. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **37**:1572-7.

Bolton, M.A., Lan, W., Powers, S.E., McClelland, M.L., Kuang, J. and Stukenberg, P.T. (2002). Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **13**, 3064-77.

Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, **14(1)**, 25-34.

Brito, D.A. and Rieder. C.L. (2006). Mitotic checkpoint slippage in vertebrates occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol*, **16** : 1194 – 1200 .

Brito, D.A. and Rieder. C.L. (2009). The Ability to Survive Mitosis in the Presence of Microtubule Poisons Differs Significantly Between Human

Nontransformed (RPE-1) and Cancer (U2OS, HeLa) Cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **66(8)**: 437-447.

Brito, D.A., Yang, Z. and Rieder, C.L. (2008). Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *J. Cell Biol*, **Vol. 182 No. 4**, 623-629.

Brown, J.R., Koretke, K.K., Birkeland, M.L., Sanseau, P., Patrick D.R. (2004). Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evol Biol*, **4(1)**:39.

Campbell, M. S. and Gorbsky, G. J. (1995). Microinjection of mitotic cells with the 3F3/2 anti-phosphoepitope antibody delays the onset of anaphase. *J. Cell Biol*. **129**, 1195-1204.

Canman, J.C., Hoffman, D.B. and Salmon, E.D. (2000). The role of pre- and post-anaphase microtubules in the cytokinesis phase of the cell cycle. *Curr Biol*, **10**, 611–614.

Carazo-Salas, R.E. and Karsenti, E. (2003). Long-range communication between chromatin and microtubules in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol*, **13(19)**, 1728-33.

Carmena, M. and Earnshaw, W.C. (2003). The Cellular Geography of Aurora Kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, **4**:842-54.

Carmena, M., Pinson, X., Platani, M., Salloum, Z., Xu, Z., Clark, A., Macisaac, F., Ogawa, H., Eggert, U., Glover, D.M., Archambault, V. and Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex activates Polo kinase at centromeres. *PLoS Biol*, **10(1)** Erratum in: *PLoS Biol*, 2012, **10(2)**.

Carmena, M., Ruchaud, S. and Earnshaw, W.C. (2009). Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol.*, **21(6)**:796-805.

Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H. and Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **13(12)**:789-803.

Castro, A., Arlot-Bonnemains, Y., Vigneron, S., Labbe, J. C., Prigent, C., and Lorca, T. (2002b). APC/Fizzy-related targets Aurora A kinase for proteolysis. *EMBO Reports*, **3**, 457-462.

Castro, A., S. Vigneron, C. Bernis, J. C. Labbe, C. Prigent, and T. Lorca. (2002a). D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Reports.*, **3**:1209-1214.

Chan, C.S. and Botstein, D. (1993). Isolation and characterization of chromosome gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics*, **135**:677-91.

Chan, G.K., and Yen, T.J. (2003). The mitotic checkpoint: a signaling pathway that allows a single unattached kinetochore to inhibit mitotic exit. *Prog Cell Cycle Res*, **5**, 431-439.

Cheetham, G.M.T., Knegt, R.M.A., Coll, J.T., Renwick, S.B., Swenson, L., Weber, P., Lippke, J.A. and Austen, D.A. (2002). Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase. *J Biol Chem*, **277**:42419-42422.

Chen, H.I., Tang, C.J., Chen, C.Y. and Tang, T.K. (2005). Overexpression of an Aurora-C kinase-deficient mutant disrupts the Aurora-B/INCENP complex and induces polyploidy. *J Biomed Sci*, **12 (2)**: 297-310.

Cimini, D., Moree, B., Canman, J.C. and Salmon ED. (2003). Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue

cells and error correction is achieved by two different mechanisms.. *J Cell Sci*, **116(Pt 20)**, 4213–4225.

Cimini D, Wan, X., Hirel, C.B., Salmon, E.D. (2006). Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr Biol*, **16**,1711–1718

Cimini, D. (2007). Detection and Correction of Merotelic Kinetochore Orientation by Aurora B and its Partners. *Cell Cycle*, **6(13)**, 1558-1564.

Cleveland, D. W., Mao, Y. and Sullivan, K. F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, **112**, 407-421.

Collas, P., Le Guellec, K. and Taskén, K. (1999). The A-kinase-anchoring protein AKAP95 is a multivalent protein with a key role in chromatin condensation at mitosis. *J Cell Biol.*, **147(6)**:1167-80.

Cooke, C.A., Heck, M.M. and Earnshaw, W.C. (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol*, **vol. 105, n° 5**, pp. 2053-2067.

Cooper, S. (2001) Revisiting the relationship of the mammalian G1 phase to cell differentiation. *J Theor Biol*, **208**, 399-402.

Courapied S, Cherier J, Vigneron A, Troadec MB, Giraud S, Valo I, Prigent C, Gamelin E, Coqueret O, Barré B. (2010). Regulation of the Aurora-A gene following topoisomerase I inhibition: implication of the Myc transcription factor. *Mol Cancer.*, **9**:205.

Crement, J.Y., Descamps, S., Vélite, F., Martin, A. and Prigent, C. (2003). Preparation and characterization of a human aurora-A kinase monoclonal antibody. *Mol Cell Biochem.*, **243(1-2)**:123-31.

Dar, A.A., Goff, L.W., Majid, S., Berlin, J. and El-Rifai, W. (2010). Aurora

Kinases' Inhibitors – Rising Stars in Cancer Therapeutics? *Mol Cancer Ther.*, **9(2)**, 268-278.

De Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Willebrords, R. and De Mey, J. (1981). Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **78(9)**:5608-612.

De Luca, M., Brunetto, L., Asteriti, I.A., Giubettini, M., Lavia, P. and G Guarguaglini (2008). Aurora-A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. *Oncogene*, **27**, 6539-6549.

De Luca, M., Lavia, P. and Guarguaglini, G. (2006). A functional interplay between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at spindle poles: Plk1 controls centrosomal localization of Aurora-A and TPX2 spindle association. *Cell Cycle*, **5(3)**:296-303.

DeLuca, J.G., Gall, W.E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., Salmon, E.D. (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell*, **127**, 969–982.

Dieterich, K., Soto-Rifo, R. Faure, A.K., Hennebicq, S., Ben Amar, B., Zahi, M., Perrin, J., Martinez, D., Sèle, B., Jouk, P.S., Ohlmann, T., Rousseaux, S., Lunardi, J. and Ray, P.F. (2007). Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet.*, **39**:661-665.

Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. and Taylor, S.S. (2003) Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*, **161**, 267-280.

Dodson, C.A., Kosmopoulou, M., Richards, M.W., Atrash, B., Bavetsias, V., Blagg J. and Bayliss, R. (2010). Crystal structure of an Aurora-A mutant that mimics

Aurora-B bound to MLN8054: insights into selectivity and drug design. *Biochem. J.*, **427**, 19-28.

Dogterom, M., Felix, M.A., Guet, C.C., Leibler, S. (1996). Influence of M-phase chromatin on the anisotropy of microtubule asters. *J Cell Biol*, **133(1)**, 125-40.

Doxsey, S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2(9)**, 688-98.

Ducat, D.C. and Zheng, Y. (2004). Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp. Cell Res.* **301**, 60-67.

Dutertre, S. and Prigent, C. (2003). Aurora-A overexpression leads to override of the microtubule-kinetochore attachment checkpoint. *Mol Interv.* **3(3)**:127-30.

Dutertre, S., Hamard-Péron, E., Cremet, J.Y., Thomas, Y. and Prigent, C. (2005). The absence of p53 aggravates polyploidy and centrosome number abnormality induced by Aurora-C overexpression. *Cell Cycle*, **4(12)**:1783-7.

Dutertre, S., Descamps, S. and Prigent, C. (2002) On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene*, **21**:6175-6183.

Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C. and Ducommun, B. (2004) Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci*, **117(Pt12)**, 2523-2531.

Earnshaw, W.C. and R.L. Bernat. 1991. Chromosomal passengers: Towards an integrated view of mitosis. *Chromosoma*, **100 (3)**:139-146.

Elkins, J.M., Santaguida, S., Musacchio, A. and Knapp, S. (2012). Crystal Structure of Human Aurora B in Complex with INCENP and VX-680. *J. Med. Chem.*, **55**, 7841-7848.

Emanuele, M.J., Lan, W., Jwa, M., Miller, S.A., Chan, C.S. and Stukenberg, P.T. (2008). Aurora B kinase and protein phosphatase 1 have opposing roles in modulating kinetochore assembly. *J Cell Biol.*, **181(2)**:241-54.

Eyers, P.A. and Maller, J.L. (2004). Regulation of Xenopus Aurora A Activation by TPX2. *J Biol Chem.*, **Vol. 279, No. 10, pp.** 9008-9015.

Eyers, P.A., Churchill, M.E., Maller, J.L. (2005). The Aurora A and Aurora B protein kinases: a single amino acid difference controls intrinsic activity and activation by TPX2. *Cell Cycle*, **4(6)**:784-9.

Famulski, J.K., Vos, L.J., Rattner, J.B. and Chan, G.K. (2011). Dynein/Dynactin-mediated transport of kinetochore components off kinetochores and onto spindle poles induced by nordihydroguaiaretic acid. *PLoS One.*, **6(1)**:e16494. Erratum in: *PLoS One.*, **6(2)**.

Fang, G. (2002). Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell*, **13**, 755–766.

Francisco, L., W. Wang, C.S. and Chan, C.S. (1994). Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4731-4740.

Fu, J., Bian, M., Jiang, Q. and Zhang, C. (2007). Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.*, **5(1)**. 1-10.

Fu, J., Bian, M., Liu, J., Jiang, Q. and Zhang, C. (2009). A single amino acid change converts Aurora-A into Aurora-B-like kinase in terms of partner specificity and cellular function. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106(17)**:6939-44.

Fumoto, K., Lee, P.C., Saya, H. and Kikuchi, A. (2008). AIP regulates stability of Aurora-A at early mitotic phase coordinately with GSK-3 β . *Oncogene*, **27**:4478-4487.

Gardner, M. K., Bouck, D.C., Paliulis, L.V., Meehl, J.B., O'Toole, E.T., Haase, J., Soubry, A., Joglekar, A.P., Winey, M., Salmon, E.D., Bloom, K. and Odde, D.J. (2008). Chromosome congression by Kinesin-5 motor-mediated disassembly of longer kinetochore microtubules. *Cell*, **135**, 894–906.

Gibbs, C.S. and Zoller, M.J. (1991). Rational scanning mutagenesis of a protein kinase identifies functional regions involved in catalysis and substrate interactions. *J. Biol. Chem.*, **266**:8923-8931.

Giet, R. and Glover, D.M. (2001). *Drosophila* Aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensing recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Biol.*, **152**, 669-681.

Giet, R. and Prigent, C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J. Cell Sci.*, **112 (Pt. 21)**: 3591-3601.

Giet, R. and Prigent, C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J. Cell Sci.*, **112 (Pt. 21)**: 3591-3601.

Giet, R. and Prigent, C. (2000). The *Xenopus laevis* aurora/Ipl1-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle. *Exp Cell Res*, **258**, 145–151.

Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M. J., Raff, J. W., Prigent, C., and Glover, D. M. (2002). *Drosophila* Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J Cell Biol*, **156**, 437–451.

Girdler, F., Sessa, F., Patercoli, S., Villa, F., Musacchio, A. and Taylor, S. (2008). Molecular basis of drug resistance in aurora kinases. *Chem. Biol.*, **15**, 552-562.

Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A. and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome séparation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, **81**, 95-105.

Gold, M.G., Barford, D. and Komander, D (2006). Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 693-701.

Gopalan, G., Chan, C.S.M. and Donovan, P.J. (1997). A Novel Mammalian, Mitotic Spindle-associated Kinase Is Related to Yeast and Fly Chromosome Segregation Regulators. *J. Cell Biol.*, **Vol 138, No 3**, 643-656.

Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E.A., Inagaki, M. (2006). Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat Cell Biol.*, **8(2)**:180-7.

Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A. and Inagaki, M. (2002). Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells*, **7**, 11-17.

Green, R.A. and Kaplan, K.B. (2003). Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol*, **163(5)**, 949-961.

Gritsko, T.M., Coppola, D., Paciga, J.E., Yang, L., Sun, M., Shelley, S.A., Fiorica, J.V., Nicosia, S.V. and Cheng, J.Q. (2003). Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/AuroraA in human ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.*, **9**, 1420-1426.

Guertin, D. A., Trautmann, S. and McCollum, D. (2002). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 155-178.

Guse, A., Mishima, M. and Glotzer, M. (2005). Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol.*, **15(8)**:778-86.

Ha, GH., Baek, KH., Kim, HS., Jeong, SJ., Kim, CM., McKeon, F. and Lee, CW. (2007). p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BubR1-mediated phosphorylation. *Cancer Res.* **67(15)**:7155–64.

Hagedorn M, Delugin M, Abrales I, Allain N, Belaud-Rotureau MA, Turmo M, Prigent C, Loiseau H, Bikfalvi A and Javerzat S. (2007). FBXW7/hCDC4 controls glioma cell proliferation in vitro and is a prognostic marker for survival in glioblastoma patients. *Cell Div.*, **2**:9.

Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A. and Oegema, K. (2001) Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, **155**, 1109-1116.

Hans, F., Skoufias, D.A., Dimitrov, S., and Robert L. Margolis, R.L. (2009). Molecular Distinctions between Aurora A and B: A Single Residue Change Transforms Aurora A into Correctly Localized and Functional Aurora B. *Mol. Biol. Cell*, **Vol. 20**, 3491-3502.

Harbuz, R., Zouari, R., Dieterich, K., Nikas, Y., Lunardi, J., Hennebicq, S. and Ray, P.F. (2009). Function of aurora kinase C (AURKC) in human reproduction. *Gynecol Obstet Fertil.*, **37(6)**:546-51.

Hauf, S. and Watanabe, Y. (2004). Kinetochore orientation in mitosis and meiosis. *Cell*, **Vol 119**, 317-327.

Heald, R., Tournebize, R., Habermann, A., Karsenti, E. and Hyman, A. (1997). Spindle Assembly in *Xenopus* Egg Extracts: Respective Roles of Centrosomes and Microtubule Self-Organization. *J Cell Biol*, **138(3)**:615–628.

Hégarat, N., Smith, E., Nayak, G., Takeda, S., Eyers, P.A. and Hochegger, H. (2011). Aurora A and Aurora B jointly coordinate chromosome segregation and anaphase microtubule dynamics. *J Cell Biol*, **195(7)**, 1103-1113.

Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K. and Saya, H. (2003) Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*, **114**, 585-598.

Hoar, K., Chakravarty, A., Rabino, C., Wysong, D., Bowman, D., Roy, N. and Ecsedy, J.A. (2007). MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. *Mol Cell Biol*, **27**, 4513–4525.

Honda, K., Mihara, H., Kato, Y., Yamaguchi, A., Tanaka, H., Yasuda, H., Furukawa, K. and Urano, T. (2000) Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex–ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene*, **19**, 2812-2819.

Howell, B.J., Hoffman, D.B., Fang, G., Murray, A.W. and Salmon, E.D. (2000). Visualization of Mad2 Dynamics at Kinetochores, along Spindle Fibers, and at Spindle Poles in Living Cells. *J Cell Biol*, **150(6)**, 1233-1250.

Howell, B.J., McEwen, B.F., Canman, J.C., Hoffman, D.B., Farrar, E.M., Rieder, C.L. and Salmon, E.D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol.*, **155(7)**:1159-72.

Howell, B.J., Moree, B., Farrar, E.M., Stewart, S., Fang, G. and Salmon, E.D. (2004). Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol*, **14(11)**, 953-964.

Hsu, J.-Y., Sun, Z.-W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., Lin, R., Smith, M.M. and Allis, C.D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora

kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, **102**, 279-291.

Huang, Y., Yao, Y., Xu, HZ., Wang, ZG., Lu, L. and Dai, W. (2009). Defects in chromosome congression and mitotic progression in KIF18A-deficient cells are partly mediated through impaired functions of CENP-E. *Cell Cycle*, **8(16)**: 2643–2649.

Huang, Y.F., Chang, M.D. and Shieh, S.Y. (2009). TTK/hMps1 mediates the p53-dependent postmitotic checkpoint by phosphorylating p53 at Thr18. *Mol Cell Biol*, **29(11)**:2935–44.

Hunt, T., Luca, F.C. and Ruderman, J.V. (1992). The requirements for protein synthesis and degradation, and the control of destruction of cyclins A and B in the meiotic and mitotic cell cycles of the clam embryo. *J. Cell Biol*, **116** : 707 – 724 .

Isola, J.J., Kallioniemi, O-P., Chu, L.W., Suzanne A. W. Fuqua, S.A.W., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K. and Waldman, F.M. (1995). Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am. J. Pathol.*, **147**, 905-911.

Iwasaki, T., Murata-Hori, M., Ishitobi, S. and Hosoya, H. (2001). Diphosphorylated MRLC is required for organization of stress fibers in interphase cells and the contractile ring in dividing cells. *Cell Struct Funct*, **vol. 26, n° 6**, pp. 677-683.

Jordan, M.A., Thrower, D.A., and Wilson, L. (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles: implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J. Cell Sci*, **102** : 401-416 .

Kallio, M.J., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T. and Gorbsky, G.J. (2002). Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. *Curr Biol*, **12**, 900-905.

Kanda, A., Kawai, H., Suto, S., Kitajima, S. and Sato, S. (2005). Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogene*, **24**, 7266-7272.

Kapoor, T.M., Lampson, M.A., Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E.D., McEwen, B.F., and Khodjakov, A. (2006). Chromosomes Can Congress to the Metaphase Plate Before Biorientation. *Science*, **311**, 388–391.

Kapoor, T.M., Mayer, T.U., Coughlin, M.L. and Mitchison, T.J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* **150**:975–988.

Katayama, H., Brinkley, W.R. and Sen, S. (2003). The Aurora kinases: Role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, **22**: 451-464.

Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M. and Sen, S. (2001). Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem.*, **276**: 46219-46224.

Ke, Y.W., Dou, Z., Zhang, J. and Yao, X.B. (2003). Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division. *Cell Research*, **13**(2):69-81.

Kellogg, D.R., Moritz, M. and Alberts, B.M. (1994). The centrosome and cellular organization. *Annu Rev Biochem*, **63**:639-674.

Khan, J., Ezan, F., Cr  met, J-Y., Fautrel, A., Gilot, D., Lambert, M., Benaud, C., Troadec, M.B. and Prigent, C. (2011). Overexpression of Active Aurora-C Kinase Results in Cell Transformation and Tumour Formation. *PLos ONE*, **6(10)**, e26512.

Khodjakov, A. and Rieder, C.L. (1999). The sudden recruitment of γ -tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle do not require microtubules. *J Cell Biol.*, **146**:585–596.

Khodjakov, A. and Rieder, C.L. (2009). The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J Biol.*, **8(10)**:88.

Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R. and Rieder, C.L. (2000). Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol*, **10(2)**, 59- 67.

Kiat, L.S., Hui, K.M. and Gopalan, G. (2002). Aurora-A kinase interacting protein (AIP), a novel negative regulator of human Aurora-A kinase. *J Biol Chem.*, **277**: 45558-45565.

Kim, Y., Holland, A.J., Lan, W. and Cleveland, D.W. (2010). Aurora kinases and protein phosphatase 1 mediate chromosome congression through regulation of CENP-E. *Cell*, **142(3)**:444-55.

Kimura, M., Kotani, S., Hattori, T., Sumi, N., Yoshioka, T., Todokoro, K. and Okano, Y. (1997a). Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13766-13771.

Kimura, M., Matsuda, Y., Eki, T., Yoshioka, T., Okumura, K., Hanaoka, F. and Okano, Y. (1997b). Assignment of STK6 to human chromosome 20q13. 2→q13. 3 and a pseudogene STK6P to 1q41→q42. *Cytogenet Cell. Genet.*, **79**, 201-203.

Kimura, M., Matsuda, Y., Sumi, N. and Okano, Y. (1998). Identification and characterization of STK12/AIK2 : a human gene related to aurora of *Drosophila* and yeast IPL1. *Cytogenet. Cell Genet.*, **82(3-4)** : 147-152.

Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T. and Okano, Y. (1999). Cell cycledependent expression and centrosome localization of a third human Aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J. Biol. Chem.*, **274**, 7334-7340.

Kinoshita, K., Noetzel, T.L and Pelletier, L., et al. (2005). Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *J Cell Biol.*, **170**:1047-55.

Kirschner, M. and Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell*, **45**, 329–342.

Kline-Smith, S.L., Khodjakov, A., Hergert, P. and Walczak, C.E. (2004). Depletion of Centromeric MCAK Leads to Chromosome Congression and Segregation Defects Due to Improper Kinetochore Attachments. *Mol. Biol. Cell*, **Vol. 15**, 1146–1159.

Knowlton, A.L., Lan, W. and Stukenberg, P.T. (2006) Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK. *Curr Biol*, **16**, 1705-1710.

Koffa, M.D., Casanova, C.M., Santarella, R., Kocher, T., Wilm, M. and Mattaj, I.W. (2006). HURP is part of a Randependent complex involved in spindle formation. *Curr Biol.*, **16**:743-754.

Kollman, J.M., Polka, J.K., Zelter, A., Davis, T.N. and Agard, David.A. (2010). Microtubule nucleating γ -TuSC assembles structures with 13-fold microtubule-like symmetry. *Nature*, Vol. 466 Issue 7308, p879.

Kronenwett, U., Castro, J., Roblick, U. J., Fujioka, K., Östring, C., Faridmoghaddam, F., Laytragoon-Lewin, N., Tribukait, B and Auer, G. (2003). Expression of Cyclins A, E and Topoisomerase II α correlates with centrosome amplification and genomic instability and influences the reliability of cytometric S-phase determination. *BMC Cell Biology*, **4**:8.

Kufer, T.A., Sillje, H.H., Korner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P. and Nigg, E.A. (2002). Human TPX2 is required for targeting aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol.*, **158**:617-623.

Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H. and Hirota, T. (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell*, **5(6)**:853-64.

Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S.L., Rosasco, S.E., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E. and Stukenberg, P.T. (2004). Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol*, **14**, 273–286.

Lacey, K.R., Jackson, P.K. and Stearns, T. (1999). Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:2817-2822.

Lampson, M.A. and Cheeseman, I.M. (2011). Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol.*, **21(3)**:133-40.

Lanni, J.S. and Jacks, T. (1998). Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol. Cell. Biol*, **18** : 1055 – 1064.

Lee, K. and Rhee, K. (2011). PLK1 phosphorylation of pericentrin initiates centrosome maturation at the onset of mitosis. *J Cell Biol*, **Vol. 195 No. 7**, 1093–1101.

Lee, C.Y., Andersen, R.O., Cabernard, C., Manning, L., Tran, K.D., Lanskey, M.J., Bashirullah, A. and Doe, C.Q. (2006). Drosophila Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev*, **20**, 3464 – 3474.

Lee, M.J., Gergely, F., Jeffers, K., Peak-Chew, S.Y. and Raff, J.W. (2001). Msps/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour. *Nat Cell Biol.*, **3**:643-9.

Li, X. and Nicklas, R. B. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature*, **373**, 630-632.

Li, X., Sakashita, G., Matsuzaki, H., Sugimoto, K., Kimura, K., Hanaoka, F., Taniguchi, H., Furukawa, K. and Urano, T. (2004). Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem*, **279**:47201-11.

Littlepage, L.E., and Ruderman, J.V. (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev.*, **16**:2274-2285.

Liu, Q and Ruderman, J.V. (2006). Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. *PNAS*, **103(15)**, 5811-5816.

Lu, L-Y., Wood, J.L., Ye, L., Minter-Dykhouse, K., Saunders, T.M., Yu, X. and Chen, J. (2008). Aurora A Is Essential for Early Embryonic Development and Tumor Suppression. *J Biol Chem.*, **Vol. 283, No. 46**, pp. 31785-31790.

Luboshits, G. and Benayahu, D. (2005). MS-KIF18A, new kinesin; structure and cellular expression. *Gene*, **351**:19-28.

Macûrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompmaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B. and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature.*, **455(7209)**:119-23.

Maia, A.F., Feijão, T., Vromans, M.J.M., Sunkel, C.E., Lens, S.M.A. (2010). Aurora B kinase cooperates with CENP-E to promote timely anaphase onset. *Chromosoma*, **119**:405–413.

Maiato, H., Deluca, J., Salmon, E. D. and Earnshaw, W. C. (2004). The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J. Cell Sci*, **117**, 5461-5477.

Manfredi, M.G., Ecsedy, J.A., Meetze, K.A., Balani, S.K., Burenkova, O, Chen, W, Galvin, K.M., Hoar, K.M., Huck, J.J., LeRoy, P.J., Ray, E.T., Sells, T.B., Stringer, B., Stroud, S.G., Vos, T.J., Weatherhead, G.S., Wysong, D.R., Zhang, M., Bolen, J.B. and Claiborne, C.F. (2007). Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *PNAS*, **104 (10)**, 4106-4111.

Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E. and Saya, H. (2003). Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem*, **278**, 51786-51795.

Marumoto, T., Hirota, T., Morisaki, T., Kunitoku, N., Zhang, D., Ichikawa, Y., Sasayama, T., Kuninaka, S., Mimori, T., Tamaki, N., Kimura, M., Okano, Y. and Saya, H. (2002). Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells*, **7**, 1173-1182.

Marumoto, T., Zhang, D. and Saya, H. (2005). Aurora-A – A gardian of poles. *Nature Review/Cancer*, **Vol. 5**, 42-50.

Matsumoto, Y., Hayashi, K. and Nishida, E. (1999). Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol*, **9**:425-428.

Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, **5**, 311-326.

Meijer, L., Jezequel, A., Roberge, M. (éditeurs) (2003). Cell Cycle Regulators as Thera- peutic Targets. *Progress in Cell Cycle Research*, **vol. 5**, Editions “Life in Pro- gress”, Roscoff, (54 chapitres), 549 pp.

Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E.A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53_{-/-} cells. *EMBO J*, **21**, 483–492.

Meraldi, P., Honda, H. and Nigg, E.A. (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev*, **14**:29-36.

Meraldi, P., Honda, H. and Nigg, E.A. (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev*, **14**:29-36.

Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A.M., Bartek, J. and Nigg, E.A. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol*, **1(2)**:88-93.

Mesilaty-Gross, S., Reich, A., Motro, B. and Wides, R. (1999). The Drosophila STAM gene homolog is in a tight gene cluster, and its expression correlates to that of the adjacent gene ial. *Gene*, **231**, 173-186.

Mondal, G., Ohashi, A., Yang, L., Rowley, M., Couch, F.J. (2012). Tex14, aPlk1-Regulated Protein, Is Required for Kinetochore-Microtubule Attachment and Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint. *Mol Cell*, **45**, 680-695.

Moritz, M., Braunfeld, M.B., Guénebaut, V., Heuser, J. and Agard, D.A. (2000). Structure of the γ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nat Cell Biol.*, **2(6)**:365-70.

Morrow, C.J., Tighe, A., Johnson, V.L., Scott, M.I., Ditchfield, C., Taylor, S.S. (2005). Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/C^{Cdc20}. *J Cell Sci*, **118(Pt 16)**: 3639-52.

Murata-Hori, M. and Wang, Y.L. (2002). Both midzone and astral microtubules are involved in the delivery of cytokinesis signals: insights from the mobility of aurora B. *J. Cell Biol.*, **Vol 159, No 1**, 45-53.

Murata-Hori, M., Fumoto, K., Fukuta, Y., Iwasaki, T., Kikuchi, A., Tatsuka, M. and Hosoya, H. (2000). Myosin II regulatory light chain as a novel substrate for AIM-1, an aurora/lpl1p-related kinase from rat. *J. Biochem. (Tokyo)*, **128**, 903-7.

Murata-Hori, M., Tatsuka, M. and Wang, Y.L. (2002). Probing the dynamics and functions of Aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1099-1108.

Musacchio, A. and Hardwick, K.G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, **3**, 731-741.

Nguyen, H.G., Chinnappan, D., Urano, T., and Katya Ravid, K. (2005). Mechanism of Aurora-B Degradation and Its Dependency on Intact KEN and A-Boxes: Identification of an Aneuploidy-Promoting Property. *Mol. Cell. Biol.*, **Vol.25, No.12**, 4977-4992.

Nigg, E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2(1)**:21-32.

Nilsson, J., Yekezare, M., Minshull, J. and Pines, J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol.*, **10(12)**:1411-20.

Niwa, H., Abe, K., Kunisada, T. and Yamamura, K. (1996). Cell-cycledependent expression of the STK-1 gene encoding a novel murine putative protein kinase. *Gene*, **169**, 197-201.

Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem*, **69**, 277-302.

Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C.V., Biggins, S. and Barral, Y. (2006). The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell.*, **125(1)**:85-98.

Nowakowski, J., Cronin, C.N., McRee, D.E., Knuth, M.W., Nelson, C.G., Pavletich, N.P., Rogers, J., Sang, B.-C., Schelbe, D.N., Swanson, R.V. and Thompson, D.A. (2002). Structures of the Cancer-Related Aurora-A, FAK, and EphA2 Protein Kinases from Nanovolume Crystallography. *Structure*, **10**, 1659-1667.

Osborn, M. and Weber, K. (1976). Cytoplasmic microtubules in tissue culture cells appear to grow from an organizing structure towards the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73(3)**, 867-871.

Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H and Bornens, M. (1992). Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol*, **108(2)**:107-128.

Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1286-1290.

Petersen, J., Paris, J., Willer, M., Philippe, M. and Hagan, I.M. (2001). The S. pombe aurora related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dépendent manner and is required for chromosome segregation. *J. Cell. Sci.*, **114**, 4371-4384.

Petersen, J. and Hagan, I.M.S. (2003). pombe Aurora kinase/survivin is required for chromosome condensation and the spindle checkpoint attachment response. *Curr. Biol.*, **13**, 590-597.

Pfleger, C.M. and Kirschner, M.W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.*, **14**:655-665.

Pines, J. and Rieder, C.L. (2001) Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol*, **3**, E3-6.

Prigent, C., and Giet, R. (2003). Aurora A and mitotic commitment. *Cell*, **114**, 531-532.

Prigent, C., Gill, R., Trower and M., Sanseau, P. (1999). In silico cloning of a new protein kinase, Aik2, related to Drosophila Aurora using the new tool: EST Blast. *In Silico Biol.*, **1(2)**: 123-8.

Pugacheva, E.N. and Golemis, E.A. (2005). The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol.*, **7**:937-46.

Reboutier, D., Troadec, M.B., Cremet, J.Y., Chauvin, L., Guen, V., Salaun, P. and Prigent, C. (2013). Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150Glued. *J Cell Biol.*, **201(1)**:65-79.

Reboutier, D., Troadec, M.B., Cremet, J.Y., Fukasawa, K. and Prigent, C. (2012). Nucleophosmin/B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J Cell Biol*, **Vol. 197 No. 1**, 19-26.

Reich, A., Yanai, A., Mesilaty-Gross, S., Chen-Moses, A., Wides, R. and Motro, B. (1999). Cloning, mapping, and expression of ial, a novel Drosophila member of the lpl1/aurora mitotic control kinase family. *DNA Cell Biol*, **18**:593-603.

Rieder, C.L., and Maiato, H. (2004). Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell*, **7**: 637 – 651 .

Riffell, J.L., Zimmerman, C., Khong, A., McHardy, L.M. and Roberge, M. (2009). Effects of chemical manipulation of mitotic arrest and slippage on cancer cell survival and proliferation. *Cell Cycle*, **8(18)**:3025-38.

Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M. and Prigent, C. (1998). The Xenopus protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J.*

Cell. Sci., **111**, 557-572.

Romé, P., Montembault, E., Franck, N., Pascal, A., Glover, D.M. and Giet, R. (2010). Aurora A contributes to p150(glued) phosphorylation and function during mitosis. *J Cell Biol.*, **189**(4):651-9.

Ruchaud, S., Carmena, M. and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers : conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **Vol. 8**, 798-812.

Sakakura, C., Hagiwara, A., Yasuoka, R., Fujita, Y., Nakanishi, M., Masuda, K., Shimomura, K., Nakamura, Y., Inazawa, J., Abe, T. and Yamagishi, H. (2001). Tumor-amplified kinase BTAK is amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. *Br. J. Cancer*, **84** (6), 824-831.

Sasai, K., Katayama, H., Stenoién, D.L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., Okano, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Nigg, E.A., Earnshaw, W.C., Brinkley, W.R. and Sen, S. (2004). Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **59**:249-263.

Schumacher, J. M., Ashcroft, N., Donovan, P. J. and Golden, A. (1998a). A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development*, **125**, 4391-4402.

Schumacher, J. M., Golden, A. and Donovan, P. J. (1998b). AIR-2: An aurora/lpl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *C. elegans* embryos. *J. Cell Biol.*, **143**, 1635-1646.

Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.Y., Yates, J.R. and Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic

entry. *Science*. **320(5883)**:1655-8.

Sen, S., Zhou, H. and White, R.A (1997). A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, **14**, 2195-2200.

Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L.B., Schneider, T.R., Stukenberg, P.T. and Musacchio, A. (2005). Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell*, **18**:379-91.

Severson, A.F. and Bowerman, B. (2002). Cytokinesis: closing in on the central spindle, *Dev Cell* 2, 4-6.

Severson, A.F., Hamill, D.R., Carter, J.C., Schumacher, J. and Bowerman, B. (2000). The Aurora-related kinase AIR-2 recruits ZEN-4/CeMKLP1 to the mitotic spindle at metaphase and is required for cytokinesis. *Curr Biol*, **10**:1162-1171.

Shannon, K.B., Canman, J.C. and Salmon, E.D. (2002). Mad2 and BubR1 Function in a Single Checkpoint Pathway that Responds to a Loss of Tension. *Mol Biol Cell*, **13**, 3706-3719.

Shindo, M., Nakano, H., Kuroyanagi, H., Shirasawa, T., Mihara, M., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Yagita, H. and Okumura, K. (1998). cDNA cloning, expression, subcellular localization, and chromosomal assignment of mammalian aurora homologues, aurora-related kinase (ARK) 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 285-292.

Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., De Antoni, A., Jeang, K.T. and Musacchio, A. (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a 'safety belt' binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J.*, **21(10)**:2496-506.

Skoufias, D.A., Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Wilson, L. and Margolis, R.L. (2001). Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *PNAS*, **98**, 4492–4497.

Slattery, S.D., Moore, R.V., Brinkley, B.R. and Hall, R.M. (2008). Aurora-C and Aurora-B share phosphorylation and regulation of CENP-A and Borealin during mitosis. *Cell Cycle*, **7(6)**:787-795.

Sluder, G and Hinchcliffe, E.H. (1998). The apparent linkage between centriole replication and the S phase of the cell cycle. *Cell Biol Int*, **22(1)**:3-5.

Song, S.J., Song, M.S., Kim, S.J., Kim, S.Y., Kwon, S.H., Kim, J.G., Calvisi, D.F., Kang, D. and Lim, D.S. (2009). Aurora A regulates prometaphase progression by inhibiting the ability of RASSF1A to suppress APC-Cdc20 activity. *Cancer Res*, **69(6)**, 2314-2323.

Stumpff, J. and Wordeman, L. (2007) Chromosome congression: the kinesin-8-step path to alignment. *Curr Biol*, **17**:326–328.

Stumpff, J., von Dassow, G., Wagenbach, M., Asbury, C. and Wordeman, L. (2008). The kinesin-8 motor Kif18A suppresses kinetochore movements to control mitotic chromosome alignment. *Dev Cell*, **14**:252–262.

Sudakin, V., Chan, G.K. and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* **154**, 925-936.

Sugiyama, K., Sugiura, K., Hara, T., Sugimoto, K., Shima, H., Honda, Furukawa, K., Yamashita, S. and Urano, T. (2002) Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene*, **21**, 3103-3111.

Suijkerbuijk, S.J., van Dam, T.J., Karagöz, G.E., von Castelmur, E., Hubner, N.C., Duarte, A.M., Vleugel, M., Perrakis, A., Rüdiger, S.G., Snel, B. and Kops, G.J.

(2012).The vertebrate mitotic checkpoint protein BUBR1 is an unusual pseudokinase. *Dev Cell.*, **22(6)**:1321-9.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B.H., Peters, J.M. (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol*, **vol. 151**, n° 4, pp. 749-762.

Takahashi, T., Futamura, M., Yoshimi, N., Sano, J., Katada, M., Takagi, Y., Kimura, M., Yoshioka, T., Okano, Y. and Saji S. (2000). Centrosomal kinases, HsAIRk1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. *Jpn. J. Cancer Res.*, **91(10)**, 1007-1014.

Tanaka, T., Kimura, M., Matsunaga, K., Fukada, D., Mori, H. and Okano, Y. (1999). Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res.*, **59**, 2041-2044.

Tanaka, T.U. (2008). Bi-orienting chromosomes: acrobatics on the mitotic spindle. *Chromosoma*, **117**, 521-533.

Tanaka, T.U. (2010). Kinetochore–microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J*, **29**, 4070-4082.

Tanaka, T.U. and Hirota, T. (2009). Chromosome segregation machinery and cancer. *Cancer Sci*, **100(7)**, 1158-1165.

Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J., and Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1- Sli15 (Aurora kinase- INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell*, **108**, 317–329.

Tanaka, T.U., Stark, M.J. and Tanaka, K. (2005). Kinetochore capture and biorientation on the mitotic spindle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, **6**, 929–942.

Tatsuka, M., Katayama, H., Ota, T., Tanaka, T., Odashima, S., Suzuki, F. and

Terada, Y. (1998). Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and lpl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res.*, **58(21)**, 4811-4816.

Taylor, S.S., Scott, M.I. and Holland, A.J. (2004). The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res*, **12**, 599-616.

Terada, Y., Tatsuka, M., Suzuki, F., Yasuda, Y., Fujita, S. and Otsu, M. (1998). AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J*, **17**:667-676.

Terada, Y., Uetake, Y. and Kuriyama, R. (2003). Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in *Drosophila* and mammalian cells. *J Cell Biol.*, **162(5)**:757-63.

Tipton, A.R., Tipton, T., Yen, T. and Liu, S-T. (2011a). Closed MAD2 (C-MAD2) is selectively incorporated into the mitotic checkpoint complex (MCC). *Cell Cycle*, **10:21**, 3740-3750.

Tipton, A.R., Wang, K., Link, L., Bellizzi, J.J., Huang, H., Yen, T., et al. (2011b). BUBR1 and Closed MAD2 (C-MAD2) Interact Directly to Assemble a Functional Mitotic Checkpoint Complex. *J Biol Chem*, **286**:21173-9

Tishler, R.,B., Lamppu, D.M., Park, S. and Price, B.D. (1995). Microtubule-active drugs taxol, vinblastine, and nocodazole increase the levels of transcriptionally active p53. *Cancer Res.* **55(24)**:6021–5.

Tomasini, R., Tsuchihara, K., Tsuda, C., Lau, S.K., Wilhelm, M., Ruffini, A., Tsao, M.S., Iovanna, J.L., Jurisicova, A., Melino, G. and Mak, T.W. (2009). TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 797–802.

Tsai, M.Y. and Zheng, Y. (2005). Aurora A kinase-coated beads function as microtubule organizing centers and enhance RanGTP-induced spindle assembly. *Curr Biol.*, **15**:2156–2163.

Tsai, M.Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C. and Zheng, Y. (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol.* **5**(3):242-8.

Tseng, T.C., Chen, S.H., Hsu, Y.P. and Tang, T.K. (1998). Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA Cell Biol.*, **17**: 823-833.

Tsou, J-H., Chang, K-C., Chang-Liao, P-Y., Yang, S-T., Lee, C-T., Chen, Y-P., Lee, Y-C., Lin, B-W., Lee, J-C., Shen, M-R., Chuang, C-K., Chang, W-C., Wang, J-M. and Hung, L-Y. (2011). Aberrantly expressed AURKC enhances the transformation and tumorigenicity of epithelial cells. *J Pathol*, **225**: 243-254.

Tung, H.Y.L., Wang, W. and Chan, C.S.M. (1995). Regulation of Chromosome Segregation by Glc8p, a Structural Homolog of Mammalian Inhibitor 2 That Functions as both an Activator and an Inhibitor of Yeast Protein Phosphatase 1. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6064-6074.

Ulisse, S., Delcros, J.G., Baldini, E., Toller, M., Curcio, F., Giacomelli, L., Prigent, C., Ambesi-Impimbato, F.S., D'Armiento, M. and Arlot-Bonnemains, Y. (2006). Expression of Aurora kinases in human thyroid carcinoma cell lines and tissues. *Int J Cancer.*, **119**(2):275-82.

Vader, G. and Lens, S.M.A. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1786**, 60-72.

Vernole, P., Neale, M.H., Barcaroli, D., Munarriz, E., Knight, R.A., Tomasini, R., Mak, T.W., Melino, G. and De Laurenzi, V. (2009). TAp73alpha binds the kinetochore proteins Bub1 and Bub3 resulting in polyploidy. *Cell Cycle*, **8**, 421–429.

Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbé, J.C., Castro, A. and Lorca, T. (2004). Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell*, **15(10)**:4584-96.

Wang, H., Somers, G.W., Bashirullah, A., Heberlein, U., Yu, F. and Chia, W. (2006). Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev*, **20**, 3453 – 3463.

Wassmann, K., Liberal, V. and Benezra, R. (2003). Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *The EMBO Journal*, **Vol. 22 No. 4** pp. 797-806.

Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. and Allis, C.D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, **97 (1)**, 99-109.

Wiese, C and Zheng, Y. (2006). Microtubule nucleation: γ -tubuline and beyond. *J Cell Sci*, **119**, 4143-4153.

Wordeman, L., and Mitchison, T.J. (1995). Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J. Cell Biol*, **128**, 95–104.

Wysong, D.R., Chakravarty, A., Hoar, K. and Ecsedy, J.A. (2009). The inhibition of Aurora A abrogates the mitotic delay induced by microtubule perturbing agents. *Cell Cycle*, **8(6)**, 876-888.

Xuelian, Luo., Zhanyun, T., Josep, R. and Hongtao, Y. (2002). The Mad2 Spindle Checkpoint Protein Undergoes Similar Major Conformational Changes Upon

Binding to Either Mad1 or Cdc20. *Molecular Cell*, **Volume 9, Issue 1**, 59-71.

Yan, X., Cao, L., Li, Q., Wu, Y., Zhang, H., Saiyin, H., Liu, X., Zhang, X., Shi, O. and Yu, L. (2005). Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. *Genes Cells*, **10**:617-26.

Yanai, A., Arama, E., Kilfin, G. and Motro, B. (1997). ayk1, a novel mammalian gene related to Drosophila aurora centrosome separation kinase, is specifically expressed during meiosis. *Oncogene*, **14**, 2950.

Yang, K-T., Li, S-K., Chang, C-C., Tang, C-J.C., Lin, Y-N., Lee, S-C. and Tang, T.K. (2010). Aurora-C Kinase Deficiency Causes Cytokinesis Failure in Meiosis I and Production of Large Polyploid Oocytes in Mice. *Mol Biol Cell*, **Vol. 21**, 2371-2383.

Yang, M., Li, B., Tomchick, D.R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H. and Luo, X. (2007). p31comet blocks Mad2 activation through structural mimicry. *Cell*.**131(4)**:744-55.

Yu, H. (2002). Regulation of APC–Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, **14**:706–714

Zavitz, K.H. and Zipursky, S.L. (1997) Controlling cell proliferation in differentiating tissues: genetic analysis of negative regulators of G1-->S-phase progression. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 773-781.

Zhang, X., Ems-McClung, S.C. and Walczak, C.E.(2008).Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity. *Mol Biol Cell*, **19(7)**:2752-65.

Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B. and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature*, **378(6557)**, 578-83.

Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R. and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.*, **20**: 189-193.

Zhou, J., Panda, D., Landen, J. W., Wilson, L. and Joshi, H. C. (2002a). Minor alteration of microtubule dynamics causes loss of tension across kinetochore pairs and activates the spindle checkpoint. *J. Biol. Chem*, **277**, 17200-17208.

Zhou, J., Yao, J., and Joshi, H. C. (2002b). Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci*, **115**, 3547-3555.

Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Levenson, J.D., Bossy-Wetzel, E., Fan, J.B., Abraham, R.T., and Jiang, W. (2005). Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol Biol Cell.*, 16(7):3187-99.

ANNEXE

Les sérine/thréonine kinases contrôlant la progression du cycle cellulaire comme cibles thérapeutiques

The serine/threonine kinases that control cell cycle progression as therapeutic targets

Alghassimou Diallo^{1,2}, Claude Prigent^{1,2}

¹ Institut de génétique et développement de Rennes, CNRS UMR 6061, 35043 Rennes, France

² Université de Rennes-I, UEB, IFR140, 2, avenue du Professeur-Léon-Bernard, 35043 Rennes Cedex, France

<Claude.Prigent@univ-rennes1.fr>

Tirés à part : C. Prigent

Pour citer cet article : Diallo A, Prigent C. Les sérine/thréonine kinases contrôlant la progression du cycle cellulaire comme cibles thérapeutiques. *Bull Cancer* 2011 ; 98 : 1335-1345.

doi : 10.1684/bdc.2011.1467.

Résumé. La progression du cycle cellulaire correspond à une série d'événements qui se succèdent pour aboutir à la division d'une cellule mère pour donner deux cellules filles. Les processus qui permettent à la cellule de se diviser sont très précisément contrôlés par une multitude de réactions enzymatiques parmi lesquelles des réactions de phosphorylation, qui font intervenir des protéines kinases, jouent un rôle clé. Les sérine/thréonine kinases sont des enzymes dont la fonction est de catalyser le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP vers une protéine substrat et plus précisément sur un acide aminé, sérine ou thréonine. Trois familles importantes de sérine/thréonine kinases sont impliquées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, les *cyclin dependent kinase* (CDK) les *polo-like kinase* (PLK) et celles de la famille Aurora. Le cancer est décrit comme un processus de division cellulaire qui n'est plus contrôlé. Les cellules prolifèrent en effet de manière anarchique et accomplissent des cycles de divisions cellulaires en ignorant les signaux contrôles. Une idée simple est donc apparue très rapidement : stopper ou ralentir la progression du cycle cellulaire reviendrait à inhiber la prolifération cellulaire et donc à lutter contre le cancer. La progression du cycle cellulaire étant contrôlée en particulier par les protéines kinase de la famille CDK, PLK et Aurora, il a été rapidement décidé de rechercher des inhibiteurs de ces protéines kinases. Cet article fera d'abord un rappel général sur la progression du cycle cellulaire et les mécanismes qui le contrôlent. Seront ensuite décrites les fonctions des protéines kinases de la famille CDK, PLK et Aurora en se concentrant sur la phase sensible de la progression du cycle qu'est la mitose. Enfin, cet article abordera les conséquences d'une inhibition des ses protéines kinases dans le cadre de la lutte contre le cancer. ▲

Abstract. Cell cycle progression corresponds to a series of events, which succeed one another to end in the division of a mother cell to give two daughter cells. The processes that allow the cell to divide are very precisely controlled by a multitude of enzymatic reactions among which protein phosphorylation, carried out by protein kinases, plays a key role. Serine/threonine kinases are enzymes that catalyse the transfer of a phosphate from ATP to a protein substrate, more precisely on a serine or threonine amino acid residue. Three important families of serine/threonine kinases are involved in the regulation of cell cycle progression, the cyclin dependent kinase (CDK) the polo-like kinase (PLK) and those of the Aurora family. The cancer is described as an uncontrolled cell division process. Cancer cells proliferate indeed in an anarchic way, and carry out cycles of cellular division by being unaware of the signals of alarm. A simple idea thus appeared soon: to stop or to slow down cell cycle progression would result in inhibiting cell proliferation and thus fighting against cancer. Cell cycle progression being controlled in particular by protein kinases of the CDK, PLK and Aurora families, it was rapidly decided to look for inhibitors of those protein kinases. We will first make a general recall on cell cycle progression and the mechanisms that control it. The functions of protein kinases of the CDK, PLK and Aurora families will then be described by concentrating on the sensitive phase of the cell cycle progression, i.e. mitosis. Finally, we will approach the consequences of the inhibition of these protein kinases within the framework of the fight against cancer. ▲

Mots clés : kinase, cycle cellulaire, cancer

Key words : kinase, cell cycle, cancer

Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire décrit des événements qui se succèdent de manière ordonnée pour permettre à une cellule de se diviser et donner deux cellules filles génétiquement identiques.

Il a d'abord été décrit comme un mécanisme biphasique : une cellule qui se divise passe en effet par une longue période de croissance, « l'interphase » (environ 24 heures pour une cellule humaine) suivie d'une courte période de division, « la mitose » (environ une heure). Cette interphase a ensuite été subdivisée en trois phases, une phase S de synthèse de l'ADN encadrée de deux intervalles ou *gap*, les phases G1 et G2. Le cycle cellulaire se divise donc en une succession de phases G1, S, G2 et M qui décrivent en fait le cycle de l'ADN (figure 1). En phase G1, la cellule prépare la phase S qui va consister à effectuer une copie de son information génétique. Elle passe ensuite en phase G2, qui est une phase de préparation à la mitose qui a été décrite à l'origine comme l'étape de répartition de l'information génétique entre les deux futures cellules filles (ségrégation des chromosomes) suivie de la séparation

physique des deux cellules filles. Finalement, cette courte phase qu'est la mitose a été subdivisée en cinq phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase, la télophase pour aboutir à la cytokinèse (figure 1). Chacune de ces étapes décrit le comportement de l'ADN et de son compartiment subcellulaire, le noyau.

En prophase, l'ADN commence à se condenser pour former des chromosomes et la membrane nucléaire commence à rompre. En prométaphase, la membrane nucléaire et donc le compartiment nucléaire ont complètement disparu. La cellule assemble le fuseau bipolaire de microtubules qui est la structure qui va assurer la répartition égale de l'information génétique dans les futures cellules filles. C'est au cours de cette phase que la condensation des chromosomes est achevée, tous les chromosomes sont alors capturés par des microtubules et alignés ensemble sur une plaque métaphasique. La métaphase est quant à elle une étape très fugace puisque, dès que la cellule a achevé la prométaphase et atteint la métaphase, elle déclenche immédiatement la ségrégation des chromosomes correspondant à l'anaphase. Cette dernière phase est elle-même subdivisée en anaphase A (séparation des chromatides sœurs) et anaphase B (allongement du fuseau accentuant la séparation). Lorsque les deux lots de chromosomes sont séparés, la cellule entre en télophase et prépare la séparation des deux cellules filles : c'est la constriction de la membrane plasmique et la mise en place du fuseau intermédiaire, puis du corps intermédiaire positionnant le lieu de séparation des deux cellules filles. La séparation physique des deux cellules ou cytokinèse a souvent eu lieu plusieurs heures après l'achèvement de la mitose, au cours de la phase G1 qui suit.

Pour bien comprendre les régulations que la cellule a mis en place pour contrôler la progression du cycle cellulaire, il faut imaginer qu'elle a deux contraintes :

- assurer la progression du cycle ;
- exercer régulièrement un contrôle qualité sur ce qu'elle produit au cours du cycle [1].

La progression dans le cycle

Les complexes *cyclin dependent kinase* (CDK)/cycline

Premièrement, la cellule progresse au cours du cycle toujours dans le même sens, la succession des phases

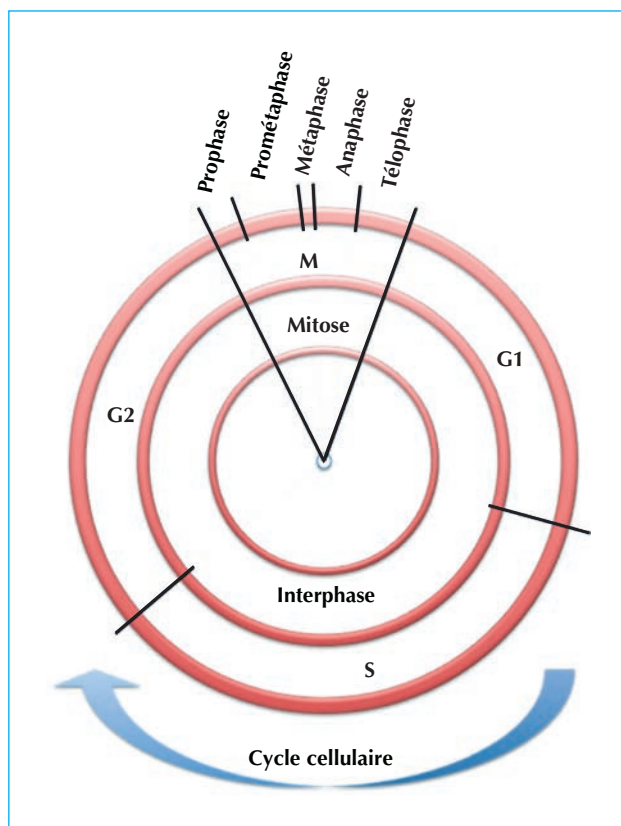


Figure 1. Les différentes phases du cycle cellulaire.

du cycle est toujours la même : G1, S, G2 et M et ainsi de suite. Notons aussi que, lorsqu'elle cesse de se diviser pour se différencier, elle sort du cycle au cours de la phase G1 pour entrer dans une phase de quiescence appelée G0.

Pour que la progression du cycle soit assurée, il faut imaginer qu'elle est contrôlée par un moteur. Ce moteur a pour objectif de faire progresser la cellule dans une phase du cycle (par exemple tout au long de la phase G1), puis il doit aussi assurer les transitions entre les phases (par exemple le passage de la phase G1 à la phase S). Le fonctionnement du moteur du cycle cellulaire peut être simplifié en disant qu'il est assuré par une activité enzymatique sérine/thréonine kinase portée par les protéines kinases de la famille des CDK pour kinase dépendante des cyclines). Ces protéines kinases sont constituées de deux protéines distinctes : l'une des deux protéines porte l'activité catalytique : c'est la sous-unité CDK ; l'autre protéine est un partenaire activateur : c'est la cycline. Il existe plus d'une dizaine de CDK différentes, différenciées par des chiffres : CDK1, CDK2, etc. (sans compter leurs isoformes) et autant de cyclines différentes différenciées par des lettres : cycline A, cycline B, etc., avec des sous-classes différenciées par des chiffres : cycline B1, cycline B2, cycline B3, etc. (sans compter leur isoformes).

Pour obtenir une activité kinase, il faut associer une CDK avec une cycline. Même s'il y a quelques préférences, on note que certaines CDK peuvent former des complexes avec des cyclines différentes et certaines cyclines avec des CDK différentes : par exemple, on trouve des complexes CDK1/cycline A et CDK1/cycline B ou encore CDK4/cycline D et CDK6/cycline D.

Comment ces complexes assurent-ils la progression du cycle ?

Il faut imaginer qu'un complexe CDK/cycline n'assure qu'une partie de la progression du cycle cellulaire. Lorsque que son rôle est achevé, son activité catalytique est éteinte et un autre complexe CDK/cycline prend alors le relais pour la partie suivante. Soit le complexe CDK/cycline suivant est totalement différent du complexe précédent, on passe par exemple d'un complexe CDK1/cycline B à un complexe CDK4/cycline D, soit un seul des partenaires change, on passe par exemple d'un complexe CDK2/cycline A à un complexe CDK1/cycline A (changement de CDK) ou encore d'un complexe CDK2/cycline E à un complexe CDK2/cycline A (changement de cycline). Ce passage

d'un complexe à l'autre assure, d'une part, la progression du cycle cellulaire et, d'autre part, le sens de progression qui est toujours le même et n'autorise pas de marche arrière, G1-S-G2-M et ainsi de suite.

Les protéines kinases *cyclin dependent kinase*

Les CDK ont été découvertes chez la levure, à partir des mutants *cdc2* chez *Saccharomyces pombe* [2] et *cdc28* chez *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Les mutants de ces deux levures présentent des défauts de progression du cycle cellulaire. Le mutant *cdc2* de *S. pombe* s'arrête en G2 car il ne peut pas effectuer de transition G2/M. Le mutant *cdc28* de *S. cerevisiae* s'arrête en G1 car il ne peut pas effectuer de transition G1/S. Le produit des deux gènes *cdc2* et *cdc28* est une protéine kinase dont l'activité est nécessaire à la fois pour la transition G1/S et G2/M. La différence observée chez les deux mutants est essentiellement due à une différence dans la durée des phases du cycle chez les deux levures, *S. pombe* possède une très longue phase G2 tandis que *S. cerevisiae* possède une très longue phase G1. Protéines kinases très conservées, la famille des CDK ne possède qu'un membre unique chez les levures alors que le génome humain possède 20 gènes codant pour de potentielles CDK.

Structure

Les kinases de la famille des CDK figurent parmi les plus petites des protéines kinases, elles possèdent une structure qui se réduit en général au domaine catalytique minimum pour une kinase. La présence de certaines séquences au sein de ce domaine, comme le domaine PISTAIRE et ses variations, ont permis de constituer des sous-groupes au sein de la famille des CDK [4].

Activation

Chaque protéine kinase de la famille des CDK doit être associée à une cycline pour révéler son activité catalytique. Les protéines kinases sont constituées de deux domaines globulaires : un petit lobe constitué de feuillets bêta et un gros lobe constitué d'hélices alpha. C'est exactement entre ces deux lobes que ce trouve le site actif qui reçoit l'ATP. Les deux lobes sont mobiles autour du site actif, ce qui permet de masquer ou découvrir le site actif. En absence de cycline, la CDK possède un site actif masqué. La cycline se fixe à la CDK en deux points, un sur le petit lobe et un sur le

grand lobe. La fixation induit alors un mouvement des deux lobes qui permet de découvrir partiellement le site actif (figure 2). L'ouverture complète du site actif n'est atteinte qu'après phosphorylation de la thréonine située dans la boucle d'activation de la kinase et cette phosphorylation est assurée par une autre kinase [5, 6]. Les CDK sont également activées par déphosphorylation de sites inhibiteurs, en particulier par la phosphatase CDC25.

Localisation

Cet aspect est relativement difficile à traiter compte tenu du très grand nombre de CDK. Il est tout de même possible d'indiquer que, comme pour leur activation, la localisation des CDK dépend de la cycline associée. D'un point de vue fonctionnel, ce mécanisme permet d'amener les CDK aux sites de localisation des cyclines pour révéler leur activité.

Fonction

Le premier membre de la famille des CDK avait été à l'origine considéré comme la *master kinase* du cycle cellulaire. En effet, l'apparition de l'activité CDK1/cycline B entraîne l'entrée en mitose tandis que la disparition de l'activité CDK1/cycline B entraîne la sortie de la mitose [7]. Comme indiqué précédemment, les complexes CDK/cycline contrôlent ainsi la progression du cycle cellulaire : la progression au cours des différentes phases ainsi que les transitions du cycle. L'identification des autres CDK a ensuite révélé que nombre d'entre elles étaient aussi impliquées dans d'autres mécanismes non liés au cycle cellulaire. C'est par exemple le cas :

- de CDK5/p35, plutôt impliquée dans le développement du cerveau ;
- de CDK7/cycline H impliquée aussi dans l'activation d'autres CDK ;
- de CDK12/cycline K impliquée dans les mécanismes de régulation de la transcription ;
- de CDK11/cycline L (la forme longue) impliquée dans l'épissage des ARN.

Les contrôles qualité

Les points de contrôle du cycle cellulaire

Le moteur de la progression du cycle cellulaire est donc assuré par les complexes CDK/cycline. En quoi consistent les contrôles qualité ? Tout au long de la progression du cycle cellulaire, la cellule a mis en place de multiples contrôles qui lui permettent d'estimer si elle peut passer à l'étape suivante. Ces contrôles ont été appelés point de contrôle (ou *checkpoints*) ; ils correspondent à des moments, au cours du cycle cellulaire où s'effectue le contrôle. Le premier de ces points de contrôle correspond au « point de restriction » qui se situe en phase G1, juste avant l'entrée en phase S. Au cours de ce contrôle, la cellule vérifie qu'elle dispose d'une quantité suffisante de nutriments et facteurs de croissance pour assurer un cycle cellulaire complet. Si la cellule détecte que les conditions ne sont pas réunies, la progression du cycle cellulaire est stoppée précisément au « point de restriction » et l'entrée en phase S est interdite. Toutes les cellules qui ont passé ce point de contrôle et qui se trouvent dans d'autres phases du cycle cellulaire, déjà en S, en G2 ou en M, continuent leur progression jusqu'au point de restriction de la phase G1 suivante où la progression de leur cycle va s'arrêter. Le passage du point de restriction ne pourra s'effectuer que lorsque les conditions seront réunies. Ce point de contrôle est en particulier sous la dépendance de la protéine du rétinoblastome, pRb, qui joue ainsi le rôle de « suppresseur de tumeur ». En absence de protéine pRb fonctionnelle, les cellules échappent aux contrôles du point de restriction et entrent en phase S sans assurance de pouvoir compléter un cycle entier. La prolifération des cellules déficientes en pRb est dite incontrôlée.

La cellule dispose ainsi de plusieurs points de contrôles tout au long du cycle. En phase G1, la progression du cycle cellulaire s'arrête également si la cellule détecte des dommages dans l'ADN et leur présence interdit

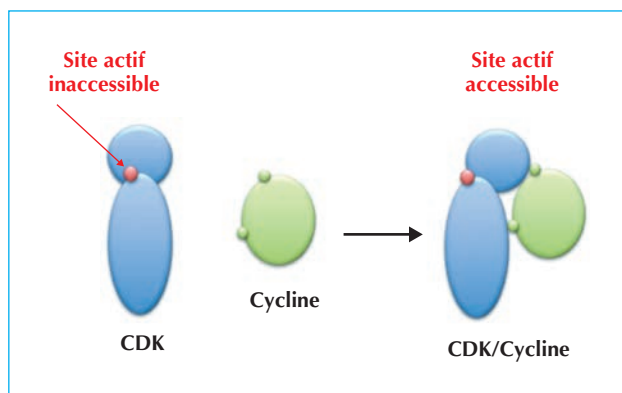


Figure 2. Activation d'une cyclin dépendante kinase (CDK) par une cycline.

également l'entrée en phase S. Ce contrôle est sous la dépendance de la protéine p53 qui est, comme pRb, un suppresseur de tumeur. En absence de p53 ou en présence d'une protéine p53 non fonctionnelle, la cellule entre en phase S en présence de dommages dans l'ADN qui vont perturber la réplication de l'ADN et être à l'origine d'une instabilité génétique.

Lorsque la cellule est en phase S, elle réplique son ADN pour effectuer une copie complète de son information génétique. Elle sort de phase S pour entrer en phase G2 et prépare l'entrée en phase M. La présence d'ADN non répliqué dans une cellule en phase G2 est détectée et provoque une interdiction d'entrée en phase M. Des points de contrôle sont également présents en mitose. Deux événements importants ont eu lieu simultanément en mitose : l'assemblage du fuseau bipolaire de microtubules et la condensation des chromosomes. La cellule contrôle avec un soin particulier de ces deux événements qui voient leur aboutissement en métaphase. Dès que cette étape est atteinte, la cellule déclenche le passage en anaphase qui se traduit par la séparation des chromatides sœurs (les deux copies du matériel génétique). Le déclenchement de l'anaphase est sous le contrôle continu du point de contrôle appelé *spindle assembly checkpoint* (SAC) ou *kinetochore attachment checkpoint* (KAC) [8]. En pratique, la cellule contrôle que chaque paire de chromatides est reliée par des microtubules aux deux centrosomes *via* leur kinétochore et cela de manière bipolaire. Cet attachement doit se traduire par l'alignement de tous les chromosomes sur la plaque métaphasique du fuseau bipolaire et la mise sous tension des chromosomes au sein du fuseau (*figure 3*).

De très nombreuses activités catalytiques sont monopolisées par la cellule pour effectuer les contrôles qualités. Parmi ses activités, la phosphorylation des protéines, assurées par des protéines kinases et des protéines phosphatases, joue un rôle central dans la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire. Parmi les nombreuses kinases impliquées, on trouve deux grandes familles que sont les kinases *polo-like kinase* (PLK) et les kinases Aurora.

Les kinases Aurora

Découvert chez la levure, le premier gène codant pour une kinase de la famille Aurora était le premier d'une liste de gènes identifiés comme étant indispensables pour contrôler la ploïdie de la cellule, le gène fut baptisé

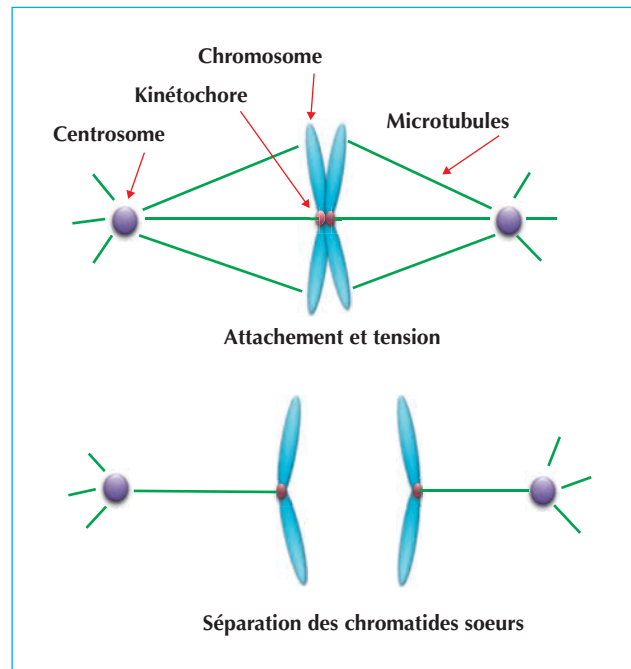


Figure 3. Ségrégation des chromosomes : les structures impliquées.

tisé *lpl1* pour *increase in ploidy one* [9]. La découverte d'un gène codant pour une kinase homologue chez un organisme multicellulaire eut lieu chez la drosophile et ce gène est d'ailleurs à l'origine du nom de la famille : Aurora [10]. Enfin, le premier gène humain codant pour une kinase de la famille Aurora a été identifié en recherchant des gènes amplifiés dans les lignées cellulaires du cancer du sein, il fut baptisé BTAK pour *breast tumor activated kinase* [11]. Un premier lien entre la famille de kinases Aurora et le cancer apparaissait. Ont ensuite été rapidement identifiés chez les mammifères deux autres gènes codant pour des kinases Aurora [12, 13]. Selon la dernière nomenclature, les trois gènes sont *AURKA*, *AURKB* et *AURKC* codant pour les kinases Aurora-A, Aurora-B et Aurora-C.

Structure

Les trois protéine kinases Aurora de mammifères dérivent d'un ancêtre commun qui est présent sous forme unique chez la levure. Les fonctions de cette enzyme unique ont ensuite été dupliquées pour donner deux kinases, Aurora-A et Aurora-B chez les eucaryotes pluricellulaires comme la drosophile, *C. elegans* et le xénope. Le passage aux mammifères a donné naissance à la troisième kinase Aurora-C, dérivant d'Aurora-B [14]. Les trois kinases partagent

la même structure avec un domaine catalytique positionné dans la partie carboxy-terminale de la protéine et un domaine amino-terminal qui varie en taille, le plus long étant présent dans Aurora-A et le plus court dans Aurora-C.

Activation

Les protéines Aurora-A possèdent toutes, dans la boucle d'activation du domaine catalytique, une thréonine qui doit être phosphorylée pour que la kinase soit active. Cette phosphorylation correspond à une autophosphorylation qui est très fortement stimulée par la fixation de la kinase à certains de ses substrats. Aurora-A, par exemple, est activée par fixation à la protéine TPX2 [15] tandis que Aurora-B est activée par la protéine INCENP, comme Aurora-C d'ailleurs [16, 17]. Le mécanisme d'activation correspond à un changement de conformation du site actif de la kinase. Ce changement induit en même temps une protection de la thréonine phosphorylée qui n'est plus accessible aux phosphatases, en l'occurrence la phosphatase PP1.

Localisation

La quantité de protéine Aurora-A et l'activité catalytique de la kinase sont maximales à la transition G2/M et en début de mitose. La protéine est ensuite dégradée en fin de mitose et au cours de la phase G1 suivante. Sa synthèse reprend au cours de la phase S. Aurora-A est localisée sur les centrosomes dès qu'ils sont dupliqués en fin de phase S, elle y réside jusqu'aux dernières phases de la mitose au cours desquelles elle est dégradée.

Comme pour Aurora-A, l'expression de la protéine Aurora-B est régulée au cours du cycle cellulaire avec un pic d'expression en G2/M, son activité kinase est maximale en mitose. Aurora-B est également dégradée en fin de mitose et début de G1 suivante. Sa localisation est, en revanche, très différente de celle de Aurora-A : Aurora-B est une protéine nucléaire localisée sur les kinétochores des chromosomes dès le début de la mitose et cela jusqu'en métaphase. Lorsque les chromatides sœurs se séparent en anaphase, Aurora-B quitte les kinétochores pour se relocaliser sur le fuseau intermédiaire et ensuite le corps intermédiaire, endroit où aura lieu la séparation physique des deux cellules filles. Aurora-B est l'activité catalytique du *chromosome passenger complex*, complexe protéique qui tire son nom de son mode de localisation en mitose chromosome-

corps intermédiaire. Ce complexe est constitué des protéines INCENP, survivine et boréaline [18]. Aurora-C se comporte exactement comme Aurora-B, mais pendant la méiose.

Fonction

Dans les cellules somatiques, l'activité kinase de Aurora-A est impliquée dans la transition G2/M, même si elle n'est pas indispensable, elle permet une coordination de l'entrée en mitose. Aurora-A est, en revanche, indispensable à la maturation des centrosomes qui consiste à recruter au niveau des centrosomes les protéines qui vont être nécessaires à l'assemblage du fuseau bipolaire de microtubules en mitose. Aurora-A est donc requise en prométaphase pour l'assemblage du fuseau qui permet à la cellule d'atteindre l'étape de métaphase (figure 4) [19].

Aurora-B est la kinase qui phosphoryle la sérine 10 de l'histone H3 en mitose, dont le rôle n'est toujours pas entièrement compris. Ce que l'on connaît mieux, c'est le rôle d'Aurora-B dans le *checkpoint* du fuseau ou SAC. L'activité kinase de Aurora-B est requise pour corriger les attachements imparfaits kinétochore/microtubule/centrosome pour qu'ils aboutissent à un attachement bipolaire parfait de chaque chromosome. L'activité kinase d'Aurora-B est aussi requise en fin de mitose pour assurer la cytokinèse qui correspond à la séparation physique des deux cellules filles (figure 4) [18].

Aurora-C assure la même fonction que Aurora-B, mais plus spécifiquement pendant la méiose.

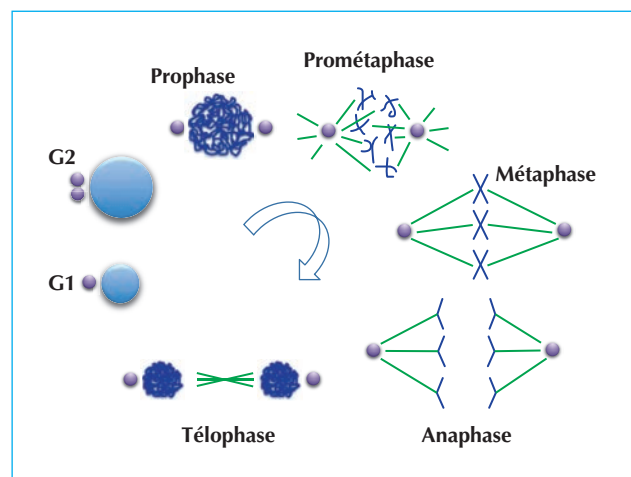


Figure 4. Les différentes sous-phases de la mitose.

Les protéines kinase *polo-like kinase*

Découverte chez la drosophile, la protéine kinase Polo à l'origine de la famille PLK est une kinase essentielle pour effectuer une mitose normale et une cytokinèse. Les protéines kinase PLK sont conservées de la levure à l'homme. Les levures possèdent une seule PLK (CDC5 chez *S. cerevisiae* et Plo1 chez *S. pombe*) alors que le génome humain code pour cinq membres de *PLK1* à *PLK5* [20].

Structure

Les protéines kinases de la famille PLK ont cela de particulier qu'elles contiennent un domaine *polo box domain* (PBD) qui les caractérise. Les kinases PLK possèdent deux domaines PBD sauf PLK4 qui n'en possède qu'un seul. Les domaines PBD ont pour fonction la reconnaissance des substrats préalablement phosphorylés par d'autres protéines kinases (en particulier CDK). Les deux domaines PBD prendraient en sandwich le site phosphorylé du substrat (figure 5).

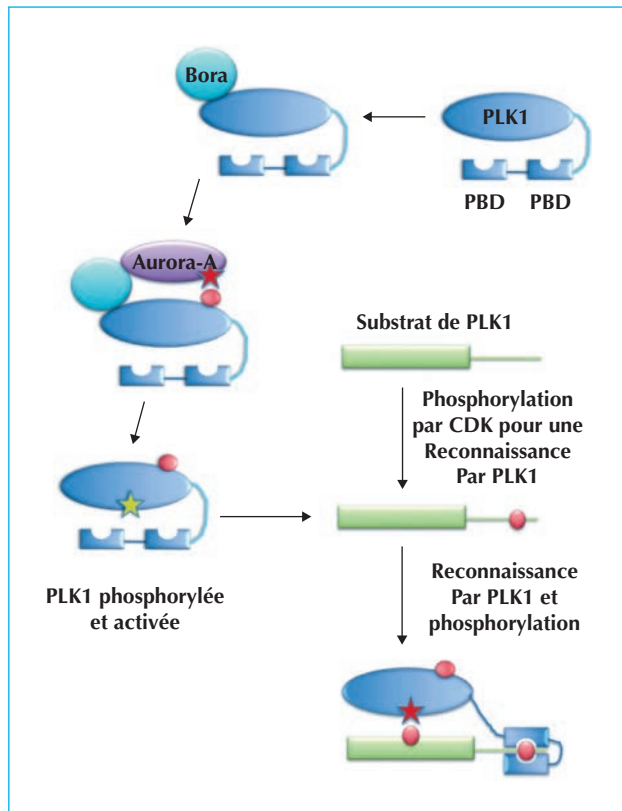


Figure 5. Activation de la protéine kinase plk1.
Pbd : *polo box domain*.

Activation

Les PLK font partie des protéines kinases qui possèdent une thréonine qui doit être phosphorylée dans leur boucle d'activation. Dans le cas de PLK1, c'est la protéine kinase Aurora-A qui assure cette fonction à l'entrée en mitose ; Aurora-A nécessite alors l'intervention de la protéine Bora qui sert d'intermédiaire pour la reconnaissance des deux kinases [21, 22] (figure 5).

Localisation

PLK1 est localisée sur les centrosomes en interphase. En mitose, elle est retrouvée au niveau des pôles du fuseau bipolaire de microtubules et sur les kinétochores des chromosomes. Dans les dernières étapes de la mitose, elle se localise sur le corps intermédiaire où elle subit une dégradation. PLK2, PLK3 et PLK4 sont également localisées sur les centrosomes en interphase. PLK3, comme PLK1, est retrouvée aux pôles du fuseau et sur le corps intermédiaire en cytokinèse. Quant à PLK5, elle est localisée dans les nucléoles.

Fonction

Les protéines kinases PLK sont impliquées dans de multiples mécanismes. PLK1, qui a été la plus étudiée est requise à toutes les étapes du cycle, en particulier dans les transitions G1/S et G2/M et dans toutes les étapes de la mitose, la maturation des centrosomes, l'assemblage du fuseau, la condensation des chromosomes, le *spindle checkpoint*, la cytokinèse. . .

PLK2 joue un rôle dans la duplication des centrosomes, PLK3 est impliquée dans les réponses aux stress alors que PLK4 est requise pour limiter la duplication des centrosomes au cours d'un cycle. Une perte d'activité PLK4 provoque une absence de duplication des centrosomes alors qu'un gain d'activité PLK4 provoque une amplification du nombre de centrosome. PLK5 ne semble pas avoir de fonction liée à la progression du cycle cellulaire [23].

Aurora, *polo-like kinase* et cancers

Rôle oncogénique des kinases Aurora et *polo-like kinase*

Une activité anormalement élevée des protéines kinases Aurora et PLK est très souvent observée dans de très nombreux types de cancers.

Le gène *AURKA* est localisé en 20q13, région génique fréquemment amplifiée dans les cancers du sein et du côlon [24, 25]. Un très grand nombre de cancers montrent également une expression anormale d'Aurora-A sans présence d'une amplification génique. Aurora-A possède des propriétés oncogéniques et sa simple surexpression dans cellules mammaires de souris suffit pour induire l'apparition de tumeurs après une longue période d'instabilité génétique [26, 27]. La surexpression d'Aurora-A est très souvent corrélée à un mauvais pronostic du cancer ; elle est également associée à une résistance aux médicaments utilisés pour traiter les cancers ou à la radiorésistance [28-31].

Aurora-B ne possède pas d'activité oncogénique mais sa surexpression stimule l'activité oncogénique d'autres gènes comme RAS et, de manière encore incomprise, la surexpression d'Aurora-B dans des tumeurs favorise également l'apparition de métastases [32]. Aurora-C, en revanche, possède une activité oncogénique [33] (résultats personnels).

PLK1 est exprimée uniquement dans les cellules qui se divisent et elle est surexprimée dans de très nombreux cancers ; elle possède également une activité oncogénique [34]. De très nombreuses méthodes d'élimination de l'activité PLK1 ont été testées, toutes indiquent clairement qu'une perte d'activité PLK1 induit un arrêt du cycle et une mort cellulaire, suggérant que PLK1 est une excellente cible [35].

PLK2, PLK3 et PLK4 semblent avoir des relations opposées à PLK1 vis-à-vis du cancer, c'est en effet une baisse d'activité des deux kinases qui est observée dans le cancer suggérant un rôle de PLK2 et PLK3 plus proche d'un suppresseur de tumeur [36, 37].

Inhibition des protéines kinases du cycle pour traiter les cancers

Il y a plusieurs raisons pour vouloir inhiber les protéines kinases du cycle pour lutter contre le cancer. La première est bien évidemment que toute activité indispensable à la progression du cycle cellulaire, et donc à la prolifération, est une cible ; inhiber cette activité, c'est arrêter la prolifération. On inhibe ici le moteur du cycle, et en général un arrêt de la prolifération se traduit par une entrée en apoptose. C'est donc le cas pour toutes les kinases dont nous avons parlé CDK, PLK et Aurora.

La deuxième raison est liée à l'activité oncogénique de certaines de ces kinases : un gain d'activité d'une de ces

kinases induit un cancer ; donc, diminuer cette activité devrait permettre de faire régresser le cancer. Ce raisonnement ne tient pas, car les protéines kinases du cycle induisent très souvent une instabilité génétique qui est, elle, à l'origine du cancer. C'est donc plutôt une accumulation d'accidents génétiques aléatoires qui statistiquement donnera naissance au cancer. C'est comme une voiture qui roule trop vite sur une route de montagne : l'excès de vitesse va être à l'origine d'une sortie de route et d'une chute dans un ravin. Lorsque la sortie de route a eu lieu, le freinage n'a plus aucun effet sur la chute.

La troisième raison est liée au fait que ces protéines kinases du cycle interviennent dans les contrôles qualités (*checkpoint*) au cours du cycle cellulaire. Dans ce cas, un gain d'activité kinase « aveugle » la cellule qui continue de progresser au cours du cycle cellulaire malgré la présence de signaux l'avertissant d'événements qui, dans une situation normale, induiraient un arrêt du cycle à des *checkpoints*. Les cellules cancéreuses surexprimant ces kinases sont ainsi insensibles à certains médicaments utilisés dans le traitement des cancers. Ces composés, qui induisent par exemple des cassures dans l'ADN (étoposide) ou une stabilisation des microtubules (paclitaxel), ne provoquent plus de réponses de la cellule qui devient résistante. Une inhibition des ces kinases dans ce cas précis permet de rétablir une sensibilité aux traitements.

Inhiber les protéines kinases du cycle : les difficultés

La spécificité de l'inhibiteur

C'est évidemment la première des difficultés. Comment déterminer la spécificité d'un inhibiteur ? Cette spécificité ne peut pas être évaluée *in vitro* puisque l'inhibiteur ne peut pas être testé contre toutes les protéines kinases du génome humain : elles ne sont pas disponibles. Une solution utilisée consiste à tester cette spécificité *in vivo*. L'action de l'inhibiteur est évaluée sur des cellules par comparaison avec l'effet de l'élimination de la protéine kinase par interférence ARN. Les deux méthodes doivent donner le même phénotype : l'élimination d'Aurora-B par ARNi supprime la phosphorylation de la sérine 10 sur l'histone H3 [38] et l'inhibition par l'hesperadin a le même effet [39]. Mais inhiber une activité kinase n'est pas la même chose qu'éliminer une protéine : Aurora-A, par exemple, possède une fonction indépendante de son activité kinase [40].

Redondance des protéines kinases

Les résultats, obtenus en éliminant les différentes CDK chez la souris, ont révolutionné notre vision des contrôles de la progression du cycle cellulaire [41]. De manière surprenante, les KO de CDK2, CDK4 et CDK6 ne sont pas létaux, indiquant que les cellules peuvent effectuer des cycles cellulaires sans l'une de ces kinases. En revanche, le KO de CDK1 est léthal, indiquant que le cycle cellulaire ne peut pas avoir lieu sans cette kinase. La surprise a été encore plus grande lorsque l'on s'est aperçu que CDK1 pouvait assurer seule le cycle cellulaire, en absence des trois kinases CDK2, CDK4 et CDK6. CDK1 est donc capable de remplacer les trois autres kinases. L'observation des souris KO pour chaque CDK a surtout mis en évidence des régulations du cycle cellulaire différentes en fonction des types cellulaires. À un état différencié d'une cellule correspond un type de contrôle du cycle cellulaire [41]. Cela a évidemment des conséquences sur les stratégies d'inhibition des CDK à adopter pour une tumeur donnée.

Des divisions asymétriques aux divisions symétriques

À nouveau, c'est grâce à l'analyse, dans un animal entier, de mutants pour les gènes codants pour les protéines kinases mitotiques que ces observations ont pu être faites. Tout d'abord, les drosophiles mutantes pour le gène Aurora-A développent des tumeurs du cerveau [42, 43]. L'origine de ces tumeurs réside dans le rôle de Aurora-A dans le contrôle de la division asymétrique des neuroblastes. Un neuroblaste se divise de manière asymétrique pour donner un nouveau neuroblaste (renouvellement des neuroblastes) et une cellule différenciée. En absence d'Aurora-A, la division asymétrique est remplacée par une division symétrique et chaque neuroblaste donne deux nouveaux neuroblastes, etc., donnant naissance à une prolifération incontrôlée (*figure 6*). L'implication d'Aurora-A dans ce type de mécanisme n'a pas encore été clairement démontrée chez les mammifères. Mais il a été observé que les souris hétérozygotes Aurora-A +/- développaient plus de tumeurs que les souris Aurora-A +/+ suggérant un rôle de suppresseur de tumeur chez la souris et, par extension, chez l'homme [44]. La même observation a été effectuée chez les souris hétérozygotes PLK1 +/-, suggérant une fonction suppresseur de tumeur également pour la protéine kinase PLK1 [45].

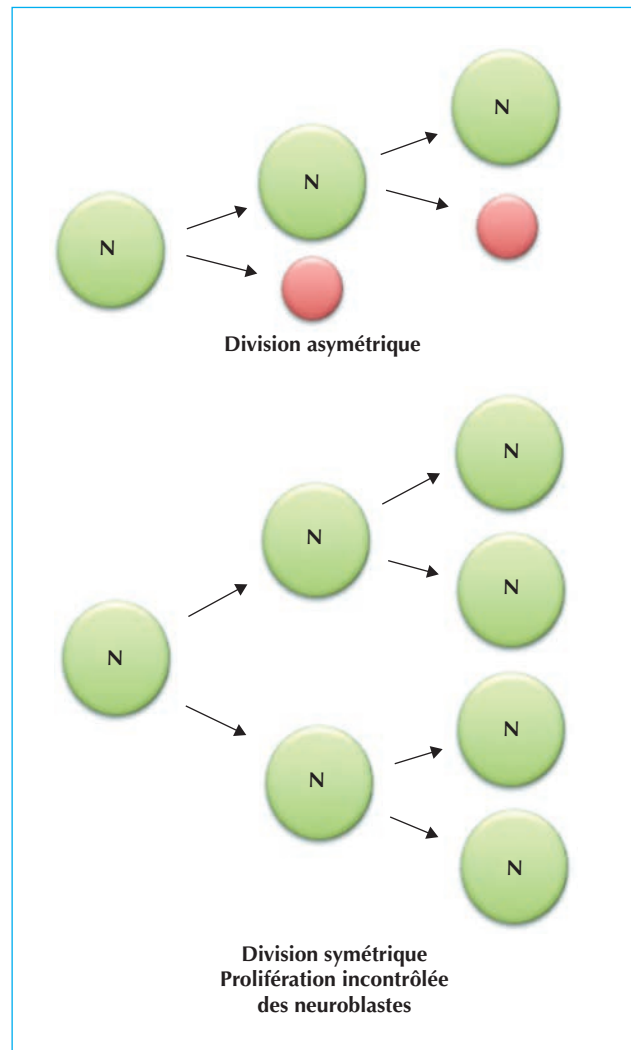


Figure 6. Division asymétrique et division symétrique.

Cela a des conséquences importantes pour la mise en place d'un traitement anti-Aurora-A ou anti-PLK1 dans le cadre du cancer car, si inhiber la kinase permet de faire régresser une tumeur, le risque avec un traitement long est de provoquer l'apparition de tumeurs secondaires.

La résistance aux inhibiteurs

La raison principale de la résistance à l'inhibition par un composé qui bloque l'activité kinase est la présence d'une mutation dans la kinase qui empêche l'inhibiteur d'être efficace. Soit la mutation est déjà présente et la tumeur est résistante à l'inhibiteur, soit le traitement par l'inhibiteur induit la sélection d'un clone possédant la mutation de résistance [46]. Cette sélection apparaît souvent avec l'utilisation de fortes doses d'inhibiteurs dans le but de faire disparaître la tumeur. Or une tumeur

est une population de cellules ayant une capacité élevée d'adaptation. Peut-être que la voie à suivre devrait consister à contenir la tumeur plutôt qu'à la faire disparaître ? On pourrait ainsi envisager des traitements qui utiliseraient des doses bien plus faibles d'inhibiteurs qui n'aboutiraient pas à la sélection de population de cellules résistantes [47].

Conclusion

De nombreux inhibiteurs des sérine/thréonine kinases CDK, PLK1 et Aurora ont déjà été identifiés, ils montrent des résultats « prometteurs » et certains sont actuellement en cours d'essais pour différents cancers [48, 49]. Mais il faut quand même avouer qu'ils n'ont pour le moment pas eu un succès comparable aux inhibiteurs de tyrosine kinases dont certains sont depuis longtemps utilisés dans les traitements anticancéreux. La complexité des régulations du cycle cellulaire en est certainement pour quelque chose. Les progrès dans ce domaine ne pourront avoir lieu sans un travail de biologie fondamentale qui permettra de mieux comprendre les différentes fonctions de ces sérine/thréonine kinases dans la cellule et dans l'organisme entier. ▼

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

1. Maller JL. Mitotic control. *Curr Opin Cell Biol* 1991 ; 3 : 269-75.
2. Nurse P, Thuriaux P. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 1980 ; 96 : 627-37.
3. Dutcher SK, Hartwell LH. The role of *S. cerevisiae* cell division cycle genes in nuclear fusion. *Genetics* 1982 ; 100 : 175-84.
4. Okuda T, Cleveland JL, Downing JR. PCTAIRE-1 and PCTAIRE-3, two members of a novel cdc2/CDC28-related protein kinase gene family. *Oncogene* 1992 ; 7 : 2249-58.
5. Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 1995 ; 376 : 313-20.
6. Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* 1996 ; 3 : 696-700.
7. Maller J, Gautier J, Langan TA, et al. Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *J Cell Sci Suppl* 1989 ; 12 : 53-63.
8. de Medina-Redondo M, Meraldi P. The spindle assembly checkpoint: clock or domino? *Results Probl Cell Differ* 2011 ; 53 : 75-91.
9. Chan CS, Botstein D. Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* 1993 ; 135 : 677-91.
10. Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 1995 ; 81 : 95-105.
11. Sen S, Zhou H, White RA. A putative serine/threonine kinase encoding gene *BTAK* on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1997 ; 14 : 2195-200.
12. Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila aurora* and budding yeast *Ipl1* that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics* 1998 ; 53 : 406-9.
13. Prigent C, Gill R, Trower M, Sanseau P. In silico cloning of a new protein kinase, Aik2, related to *Drosophila aurora* using the new tool: EST Blast. *In Silico Biol* 1999 ; 1 : 123-8.
14. Brown JR, Koretke KK, Birkeland ML, Sanseau P, Patrick DR. Evolutionary relationships of *aurora* kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evol Biol* 2004 ; 4 : 39.
15. Tsai MY, Wiese C, Cao K, et al. A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol* 2003 ; 5 : 242-8.
16. Bishop JD, Schumacher JM. Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 27577-80.
17. Li X, Sakashita G, Matsuzaki H, et al. Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 201-11.
18. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 798-812.
19. Barr AR, Gergely F. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* 2007 ; 120 : 2987-96.
20. de Cárcer G, Manning G, Malumbres M. From Plk1 to Plk5: functional evolution of Polo-like kinases. *Cell Cycle* 2011 ; 10 : 2255-62.
21. Macürek L, Lindqvist A, Lim D, et al. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 2008 ; 455 : 119-23.
22. Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 2008 ; 320 : 1655-8.
23. van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 2006 ; 5 : 853-64.
24. Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, et al. A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 1998 ; 17 : 3052-65.
25. Zhou H, Kuang J, Zhong L, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 1998 ; 20 : 189-93.
26. Zhang D, Hirota T, Marumoto T, et al. Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene* 2004 ; 23 : 8720-30.
27. Wang X, Zhou YX, Qiao W, et al. Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. *Oncogene* 2006 ; 25 : 7148-58.
28. Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. Aurora-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 2003 ; 3 : 51-62.
29. Cazales M, Schmitt E, Montembault E, Dozier C, Prigent C, Ducommun B. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* 2005 ; 4 : 1233-8.
30. Krystyniak A, Garcia-Echeverria C, Prigent C, Ferrari S. Inhibition of Aurora A in response to DNA damage. *Oncogene* 2006 ; 25 : 338-48.
31. Guan Z, Wang XR, Zhu XF, et al. Aurora-A, a negative prognostic marker, increases migration and decreases radiosensitivity in cancer cells. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 10436-44.

32. Ota T, Suto S, Katayama H, *et al.* Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 5168-77.
33. Tsou JH, Chang KC, Chang-Liao PY, *et al.* Aberrantly expressed AURKC enhances the transformation and tumorigenicity of epithelial cells. *J Pathol* 2011 ; 225 : 243-54.
34. Smith MR, Wilson ML, Hamanaka R, *et al.* Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; 234 : 397-405.
35. Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, Miyakawa I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene* 2005 ; 24 : 287-91.
36. Degenhardt Y, Lampkin T. Targeting Polo-like kinase in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2010 ; 16 : 384-9.
37. Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, *et al.* Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010 ; 51 : 857-68.
38. Giet R, Glover DM. *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* 2001 ; 152 : 669-82.
39. Hauf S, Cole RW, LaTerra S, *et al.* The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 2003 ; 161 : 281-94.
40. Toya M, Terasawa M, Nagata K, Iida Y, Sugimoto A. A kinase-independent role for Aurora A in the assembly of mitotic spindle microtubules in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat Cell Biol* 2011 ; 13 : 710-6.
41. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009 ; 9 : 153-66.
42. Lee CY, Andersen RO, Cabernard C, *et al.* *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev* 2006 ; 20 : 3464-74.
43. Wang H, Somers GW, Bashirullah A, Heberlein U, Yu F, Chia W. Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev* 2006 ; 20 : 3453-63.
44. Lu LY, Wood JL, Ye L, *et al.* Aurora A is essential for early embryonic development and tumor suppression. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 31785-90.
45. Lu LY, Wood JL, Minter-Dykhouse K, *et al.* Polo-like kinase 1 is essential for early embryonic development and tumor suppression. *Mol Cell Biol* 2008 ; 28 : 6870-6.
46. Girdler F, Sessa F, Patercoli S, Villa F, Musacchio A, Taylor S. Molecular basis of drug resistance in aurora kinases. *Chem Biol* 2008 ; 15 : 552-62.
47. Gatenby RA. A change of strategy in the war on cancer. *Nature* 2009 ; 459 : 508-9.
48. Katayama H, Sen S. Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules. *Biochim Biophys Acta* 2010 ; 1799 : 829-39.
49. Schöffski P. Polo-like kinase (PLK) inhibitors in preclinical and early clinical development in oncology. *Oncologist* 2009 ; 14 : 559-70.

VU :

Le Directeur de Thèse

Dr PRIGENT Claude

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,

Dr Régis GIET